



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**Efeito dos Exossomas de *Trypanosoma brucei* na Imunoactivação
de Macrófagos Murinos**

Joana Palma Machado Marques

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS NA
ESPECIALIDADE DE BIOLOGIA MOLECULAR EM MEDICINA TROPICAL E INTERNACIONAL, PELA UNIVERSIDADE
NOVA DE LISBOA, INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL**

(ABRIL, 2018)



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Efeito dos Exossomas de *Trypanosoma brucei* na Imunoactivação
de Macrófagos Murinos

Autor: Joana Palma Machado Marques

Orientadora: Prof. Dr. Gabriela Santos-Gomes (IHMT-UNL)

Co-Orientador: Prof. Dr. Marcelo Sousa Silva (UFRN - Brasil e IHMT-UNL)

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de
Mestre em Ciências Biomédicas

AGRADECIMENTOS

O meu primeiro e mais sincero agradecimento é para a minha orientadora, Professora Doutora Gabriela Santos-Gomes, foi um privilégio e um orgulho poder aprender consigo. Obrigado por me ter recebido no laboratório e por todos os ensinamentos disponibilizados. Foi sem dúvida uma grande mais valia poder desenvolver um trabalho de investigação com a sua orientação e é com muito carinho que vou guardar esta experiência para a vida, quer a nível científico, quer a nível pessoal. O meu sincero obrigado.

Ao meu co-orientador Dr. Marcelo Sousa-Silva, pela partilha de conhecimentos e atenção disponibilizada.

À Doutora Dinora Lopes, ao senhor Vítor e à dona Rosário pelo auxílio ao nível do trabalho realizado no biotério.

À Professora Graça Alexandre-Pires, por toda a ajuda e dedicação demonstrada no decorrer deste trabalho.

Ao professor Doutor Celso Cunha, que como coordenador deste mestrado, se mostrou sempre disponível.

À Áurea Gabriel, pela disponibilidade e partilha de conhecimentos.

A todos os colegas de laboratório, Doutor João Tavanez, Marina, Rafael, pela partilha de material, de conhecimentos e pelo bom ambiente vivido no laboratório.

A todos os meus colegas de mestrado e em especial à Sandra e à Rita, pelas conversas, desabafos e risos que acompanharam este nosso percurso.

Às minhas colegas de trabalho, Mónica Costa e Patrícia Barbosa, pelo apoio e carinho demonstrados.

À Patrícia Gonçalves, pelo companheirismo, amizade e partilha. Desejo-te o melhor.

À minha grande companheira, Tatiana. Foi um prazer fazer este percurso contigo. Nunca me vou esquecer desta experiência e espero que continuemos em muitas mais. Obrigada pela amizade. És Grande miúda...

E por último mas com toda importância, quero a agradecer à minha família, em particular, ao Ricardo, Mãe, Guida e Zeca. No fundo sem eles nada disto teria sido possível, obrigado por me apoiarem e ajudarem a superar as dificuldades. Nem sempre foi fácil. Um especial agradecimento aos meus filhos pela motivação e força que me ajudaram a encontrar....Adoro-vos Muito ♥.

RESUMO

A tripanossomose africana é uma doença parasitária negligenciada de grande importância para a saúde pública e constitui um grave problema para a agricultura nas áreas endêmicas. Esta doença parasitária afeta por ano cerca de 5000 humanos e milhões de animais na África subsaariana. Os tratamentos atuais são limitados, difíceis de administrar e muitas vezes tóxicos, causando lesões ou morte em muitos doentes. A transmissão do parasita aos hospedeiros mamíferos é efetuada através da picada da mosca Tsé-tsé. Após a picada, o parasita é introduzido no hospedeiro mamífero e gera uma série de acontecimentos que conduzem à intervenção do sistema imunitário do hospedeiro. Os macrófagos desempenham um papel fundamental na defesa inata contra o tripanossoma. No entanto, este mecanismo de defesa, bem como as estratégias que o parasita usa para escapar ao sistema imunitário do hospedeiro, estão longe de ser totalmente compreendidas. As formas sanguíneas (BSFs) de *T. brucei* têm a capacidade de produzir nanotubos na membrana flagelar que se dissociam para formar nanovesículas extracelulares, os exossomas. Os exossomas contêm várias proteínas flagelares que funcionam como fatores de virulência, bem como, um tipo de proteína associada à resistência ao soro (SRA) que protege o parasita dos efeitos nocivos da resposta imunitária do hospedeiro. O presente estudo tem como objetivo a análise do efeito dos exossomas de *Trypanosoma brucei brucei* na atividade dos macrófagos, avaliando os níveis de ureia e óxido nítrico e a expressão de moléculas de classe I (MCHI) e classe II (MHCII) do complexo maior de histocompatibilidade na superfície membranar dos macrófagos. A caracterização da ativação macrofágica através dos ensaios colorimétricos demonstrou que ambos os fenótipos M1 e M2 foram expressos e que os exossomas de *T. b. brucei* desempenham um papel na indução desses dois tipos de macrófagos. Os resultados da citometria de fluxo indicaram que o parasita inibe a diferenciação das subpopulações de macrófagos MHCII⁺ e macrófagos MHCII⁺, mas os exossomas promovem a expansão dessas subpopulações. Contudo, apenas os exossomas iniciais (48h) promoveram a expansão de macrófagos MHCII⁺ e induziram o aumento das moléculas de superfície MHCII, possibilitando a apresentação antigénica aos linfócitos Th e induzindo a imunidade adaptativa. Este estudo analisou pela primeira vez o efeito dos exossomas de *T. b. brucei* na atividade macrofágica. Os exossomas podem comportar-se de modo semelhante ao parasita, amplificando a modulação do sistema imunitário do hospedeiro ou podem comportar-se de modo oposto ao do parasita, favorecendo a progressão da infeção, mas também interferindo na regulação da resposta adaptativa do hospedeiro. Esses resultados possibilitaram esclarecer alguns dos aspetos da resposta imunitária inata e da indução da resposta adaptativa na fase inicial da infeção por *T. b. brucei*. Compreender esses mecanismos pode contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias de controlo que conduzam à eliminação da tripanossomose africana.

Palavras-chave: Tripanossomose Africana; *Trypanosoma brucei brucei*; Exossomas; Imunidade inata, Atividade macrofágica; Apresentação antigénica

ABSTRACT

African trypanosomiasis is a neglected parasitic disease that still is of great public health relevance and a severe impediment to successful agriculture activities in endemic areas. This parasitic disease affects 5000 humans and millions of livestock in sub-Saharan Africa every year. Current treatments are limited, difficult to administer and often toxic, causing long-term injury or death in many patients. The parasite is transmitted to mammalian hosts by the bite of tse-tse fly. After the bite, the parasite will generate a series of events, leading to the intervention of the host immune system. Macrophages are known to play a key role in the innate defense against trypanosomiasis. However, this defense mechanism and the parasite strategies to escape the host immune response are far from being fully understood. *Trypanosoma brucei* bloodstream forms (BSFs) have the ability to produce nanotubes from the flagellar membrane. These nanotubes dissociate to form extracellular nanovesicles, the exosomes. Exosomes incorporate flagellar proteins that are identified as virulent factors and a type of serum resistant associated protein (SRA) that protects the parasite from the harmful effects of host immune response. Thus, the present study aims to analyze the effect of *T. brucei brucei* exosomes on macrophage activity, evaluating the levels of urea and nitric oxide and assessing the membrane expression of class I (MHCI) and class II (MHCII) molecules of major histocompatibility complex. Characterization of macrophage activation through colorimetric assays demonstrated that both M1 and M2 phenotypes were expressed and that *T. b. brucei* exosomes had a role in inducing both macrophage types. In addition, flow cytometry results indicated that the parasite inhibits the differentiation MHCII⁺ and MHCII⁺ macrophages. Exosomes induce the expansion of both these subpopulations. Only the initial (48h) exosomes promoted the expansion of MHCII⁺ macrophages and increase the density of MHCII surface molecules, enabling antigen presentation to Th lymphocytes and inducing adaptive immunity. To the best of our knowledge, this study evaluates for the first time first the effect of *T. b. brucei* exosomes in macrophage activity. Parasite and exosomes may have similar effects on macrophages, amplifying the modulation of the host's immune system or may have opposite effects, favoring infection outcome, but also regulating host adaptive immune response. These results made it possible to clarify some aspects of the innate immune response and the induction of the adaptive response in the initial phase of *T. b. brucei*. Understanding these mechanisms can contribute to the development of new control strategies leading to the elimination of African trypanosomiasis. These results have made possible to clarify some aspects of innate immune response in the initial phase of infection and investigate the induction of adaptive immune response. Understanding these mechanisms may contribute to the development of new strategies for control and elimination of African Trypanosomiasis.

Keywords: African Trypanosomiasis; *Trypanosoma brucei brucei*; Exosomes; Innate immunity, Macrophage activity; Antigenic presentation

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	i
RESUMO	iii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Tripanossomas Africanos.....	1
1.1.1. Conceitos Gerais.....	1
1.1.2. Características Morfológicas dos <i>Trypanosoma brucei</i>	2
1.1.3. Ciclo de Vida de <i>Trypanosoma brucei</i>	4
1.1.4. Vetor - A Mosca Tsé-Tsé	5
1.1.5. Tripanossomose Humana Africana (HAT).....	6
1.1.6. Tripanossomose Animal Africana (AT).....	7
1.1.7. Terapêutica dirigida à AT e à HAT.....	8
1.1.8. Bioquímica de Tripanossomas Africanos.....	9
1.1.9. Interação entre o Parasita e o Hospedeiro	11
1.2. Resposta Imunitária vs. Tripanossomas.....	13
1.2.1. Resposta imunitária inata.....	14
1.2.2. Resposta imunitária adquirida.	15
1.2.3. Infecção por <i>Trypanosoma</i>	16
1.2.4. Mecanismos de Escape de <i>Trypanosoma</i> ao Sistema Imunitário do Hospedeiro Mamífero.....	19
1.3. Exossomas.....	21
1.3.1. Características e Função dos Exossomas	22
1.3.2. Exossomas de <i>Trypanosoma brucei</i>	23
2. OBJETIVOS.....	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27

3.1. Desenho Experimental.....	27
3.2. Linha Celular de Macrófagos.....	28
3.3. Infecção de murganhos com <i>Trypanosoma brucei brucei</i>	28
3.4. Isolamento e cultura de <i>T. b. brucei</i>	29
3.5. Isolamento de nanovesículas a partir de culturas de <i>T. b. brucei</i>	29
3.6. Microscopia Eletrónica de Varrimento.....	30
3.7. Ensaio de Nanotecnologia.....	30
3.8. Produção de óxido nítrico por macrófagos expostos a <i>T. b. brucei</i> e a exossomas	31
3.9. Produção de ureia por macrófagos expostos a <i>T. b. brucei</i> e a exossomas	32
3.10. Expressão de MHCI e MHCII por macrófagos expostos a <i>T. b. brucei</i> e a exossomas.....	33
3.11. Análise de Resultados.....	34
4. RESULTADOS.....	37
4.1. <i>T. b. brucei</i> emite exossomas.....	37
4.2. Os exossomas de <i>T. b. brucei</i> são ricos em proteína e RNA.....	38
4.3. Macrófagos expostos a <i>T. b. brucei</i> e a exossomas parasitários produzem óxido nítrico e ureia.....	40
4.4. Exossomas de <i>T. b. brucei</i> promovem a expansão das subpopulações de macrófagos MHCI ⁺ , MHCII ⁺ e MHCI ⁺ MHCII ⁺	47
5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....	53
6. BIBLIOGRAFIA.....	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática das formas morfológicas de <i>Trypanosoma brucei</i>	3
Figura 2 - Ciclo de vida de <i>Trypanosoma brucei</i>	5
Figura 3 - Esquema representativo da diferenciação das diferentes formas LS e SS de tripomastigotas ao longo do tempo	12
Figura 4 - Esquema representativo das duas vias de ativação de macrófagos	18
Figura 5 - Esquema representativo da variação da expressão da VSG durante a infecção por <i>Trypanosoma brucei</i>	21
Figura 6 - Esquema representativo do trabalho experimental realizado.....	27
Figura 7 - Via metabólica da arginina (aminoácido essencial) em macrófagos que conduz à produção de óxido nítrico (NO) e de citrulina.	31
Figura 8 - Via metabólica da arginina (aminoácido essencial) em macrófagos com produção de ureia e ornitina.....	32
Figura 9 - Topografia de nanovesículas libertadas por <i>T. b. brucei</i>	37
Figura 10 - Dimensão e concentração de nanopartículas libertadas por <i>T. b. brucei</i>	38
Figura 11 - Representação gráfica dos níveis proteicos, de DNA e RNA de exossomas de <i>T. b. brucei</i> ao longo do tempo.	39
Figura 12 - Evolução dos níveis de proteína (A), DNA (B) e RNA (C) em exossomas de <i>T. b. brucei</i> ao longo do tempo.....	40
Figura 13 - Produção de ureia por macrófagos expostas a <i>T. b. brucei</i> e a exossomas parasitários.	43
Figura 14 - Produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos expostas a <i>T. b. brucei</i> e a exossomas parasitários.	44
Figura 15 - Produção de <i>Novo</i> de NO e ureia por macrófagos expostas a <i>T. b. brucei</i> e a exossomas parasitários.	45
Figura 16 - Acumulação de ureia por macrófagos expostas a <i>T. b. brucei</i> e a exossomas	46
Figura 17 - Dot-plots representativos de macrófagos estimulados por <i>T. b. brucei</i> e exossomas parasitários.	49
Figura 18 - Frequência de macrófagos MHC ^I ⁺ , macrófagos MHC ^{II} ⁺ e macrófagos duplos positivos (MHC ^I ⁺ MHC ^{II} ⁺) induzido por <i>T. b. brucei</i> e exossomas parasitários.....	50
Figura 19 - Níveis de densidade membranar de MCHI e MHCII em macrófagos expostos a <i>T. b. brucei</i> e exossomas de 48h e de 7 dias.....	51
Figura 20 - Correlação entre a frequência de macrófagos MHC ^I ⁺ e MHC ^{II} ⁺ e a densidade das moléculas MCHI e MHCII ao longo do tempo de exposição a parasitas viáveis e a exossomas	

.....	52
Figura 21 - Modelo representativo das interações que se estabelecem entre <i>T. b. brucei</i> e exossomas parasitários com os macrófagos do hospedeiro.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS

- g*** – Gravidade
- ACs** – Anticorpos
- APt** – Via alternativa
- AT** – Tripanossomose Animal Africana
- ATP** – Adenosina trifosfato
- ACK** – Tampão de lise amónia cloreto potássio
- AdC** – Ciclase Adenilase
- APC** – Células Apresentadoras de Antígeno
- BSA** – Albumina de Soro de Bovino
- BSFs** – Formas sanguíneas de *T.b.brucei*
- CP** – Controlo Positivo
- CPt** – Via Clássica
- CN** – Controlo Negativo
- DCs** – Células Dendríticas
- Dicer1** – Gene que codifica para uma proteína ribonuclease tipo III
- FBS** – Soro Fetal de Bovino
- FI** – Intensidade de Fluorescência
- FITC** – Isotiocianato de Fluoresceína
- GPI** – Glicosilinositolfosfato
- GIP-sVSG** – Glicosilinositolfosfato ligado a Glicoproteína de Superfície Variante.
- gp63** – Glicoproteína de 63 kDa
- HAT** – Tripanossomose Humana Africana
- Ig** – Imunoglobulina
- IHMT** – Instituto de Higiene e Medicina Tropical
- IFN** – Interferão
- IL** - Interleucina
- kDNA** –DNA cinetoplastidial
- LPt** – Via da Lectina
- LS** – Forma *long Slender* de *T.b.brucei*
- MAC** – Complexo de ataque à membrana
- MEV** – Microscopia eletrónica de Varrimento

MCFs – Formas metacíclicas de *T.b.brucei*

MHC – Complexo Maior de Histocompatibilidade

MHCI – Moléculas de classe I do Complexo Maior de Histocompatibilidade

MHCII – Moléculas de classe II do Complexo Maior de Histocompatibilidade

MyD88 – *Myeloid differentiation primary response protein 88*

NADH - Forma reduzida do dinucleótido de nicotinamida e adenina

NAD - Forma oxidada do dinucleótido de nicotinamida e adenina

NO – Óxido Nítrico

NO₂ – Nitrito

NO₃ – Nitrato

NOS2 – Sintetase 2 de óxido nítrico

OMS – Organização mundial de saúde

PAMPs – Padrões moleculares comuns a agentes patogénicos

PBS – Tampão fosfato-salino (*Phosphate-buffered saline*)

PE – Ficoeritrina

PPRs – Receptores de reconhecimento de Padrões

PMA – Phorbol-12-*miristato*-13-*acetato*

RNA – Ácido ribonucleico

RPMI - *Roswell Park Memorial Institute*

SNC – Sistema nervoso central

SRA – Proteína do soro associada à resistência

SS – Forma *short stumpy* de *T.b.brucei*

TCA – Ciclo do ácido tricarboxílico

TCR – Recetores de células T

TbKHC-1 – Cadeia pesada da cinesina derivada de *T.b.brucei*

TGF – Fator de crescimento tumoral

Th – T auxiliares

TNF- α – Fator de necrose tumoral

VSG- Glicoproteína Variável de Superfície

1. INTRODUÇÃO

1.1. Tripanossomas Africanos

1.1.1. Conceitos Gerais

Os tripanossomas africanos são protozoários com capacidade para causar doença em seres humanos e em animais, o que constitui um problema de grande importância a nível de saúde pública, com consequências negativas no desenvolvimento socioeconómico das populações.

Nos seres humanos, a doença causada por *Trypanosoma brucei* é designada por tripanossomose humana africana (*human african trypanosomiasis*, HAT) ou doença do sono e nos animais é denominada por tripanossomose animal (*animal trypanosomiasis*, AT) ou por Nagana, quando o animal afetado é um bovino (Matthews et al., 2015). A infeção por este protozoário acontece através da picada do vetor primário, a mosca tsé-tsé (*Glossina sp.*) que é endémica na África subsariana (Torr & Vale 2015). Os sintomas iniciais da doença do sono são principalmente febre, dores de cabeça e dores musculares. À medida que a doença progride, o sistema nervoso central (SNC) do hospedeiro fica cada vez mais comprometido, evidenciando-se um cansaço extremo, denominando-se por isso esta doença como doença do sono.

Por apresentarem consequências tão debilitantes, quer em humanos, quer no gado, a doença causada por estes protozoários afeta significativamente o desenvolvimento socioeconómico da África subsaariana (Cattand et al., 2001; Franco et al., 2014). Foi estimado que cerca de 70 milhões de pessoas por ano correm o risco de contrair a doença do sono em África (Malvy & Chappuis, 2011).

A distribuição dos tripanossomas africanos coincide principalmente com o habitat do vetor, ou seja com a distribuição da mosca tsé-tsé (Franco et al., 2014). Estes protozoários unicelulares são estritamente extracelulares, pertencem à família Trypanosomatidae e ao género *Trypanosoma* (Barrett et al., 2003). Este género divide-se em três subespécies, *T. b. rhodesiense*, *T. b. gambiense* e *T. b. brucei*. As subespécies *T. b. rhodesiense* e *T. b. gambiense* causam doença em humanos, sendo que a subespécie *T. b. brucei* é apenas infecciosa para animais. Existem ainda outras duas espécies de tripanossoma, *T. congolense* e *T. vivax*, que também são infecciosas para animais (Steverding, 2008).

O género *Trypanosoma* pode ser dividido essencialmente em dois grupos: o grupo salivaria e o grupo estercorária. Esta divisão é efetuada com base no tipo de habitat em que vivem os parasitas no vetor. Isto é, parasitas pertencentes ao grupo salivaria completam o ciclo biológico e permanecem no estômago do vetor. Enquanto os parasitas pertencentes ao grupo estercorária completam o ciclo de vida e permanecem no intestino do vetor. Os parasitas africanos estão incluídos no grupo salivaria (Baral, 2010).

Como os parasitas que causam HAT são muito semelhantes ao *T. b. brucei* e como existem poucos modelos murinos para a investigação de HAT, *T. b. brucei* é o protozoário mais utilizado na investigação desenvolvida quer para HAT quer para AT (Keita et al., 1997).

1.1.2. Características Morfológicas de *Trypanosoma brucei*

A morfologia celular externa, o tamanho do tripanossoma e a sua forma variam de acordo com o ambiente (hospedeiro) em que está inserido. Podendo ser designado por tripomastigota (Fig. 1A e B) ou por epimastigota (Fig. 1C). No hospedeiro mamífero, a forma tripomastigota apresenta tamanho entre 16 a 42 µm, enquanto no vetor, a forma epimastigota pode variar entre 10-35 µm (Sharma et al., 2009).

Apresenta morfologia celular interna característica dos eucariotas, contudo dispõe de uma única mitocôndria alongada que contém uma área com DNA altamente condensado. Quando o parasita é corado com o corante de Giemsa (que tem afinidade por ácidos nucleicos), a área de DNA condensado da mitocôndria é facilmente observável ao microscópio ótico, tendo sido designado por cinetoplasto (Fig. 1E) e o DNA por DNA do cinetoplasto ou kDNA (*kinetoplast DNA*) (Baral, 2010).

Na forma tripomastigota, o cinetoplasto está localizado na região posterior do tripanossoma, assumindo o kDNA uma posição pós-nuclear. Na forma epimastigota o kDNA assume uma posição pré-nuclear, estando localizado numa posição anterior ao núcleo (Fig. 1A, B e C) (Baral, 2010; Maslov et al., 2013). Apresenta também um bolso flagelar resultante da invaginação da membrana plasmática que é o local onde o flagelo tem início (Fig. 1E).

O flagelo desempenha um papel fundamental na sobrevivência deste parasita, uma vez que é responsável pela mobilidade celular necessária às formas sanguíneas (*bloodstream forms*, BSFs) e promove a ligação do parasita à superfície celular do

hospedeiro (Baral, 2010). Nas formas de tripomastigota e epimastigota, o flagelo emerge de uma abertura lateral do bolso flagelar (Maslov et al., 2013) (Fig.1E).

O glicossoma é um organelo de grande importância para a obtenção de energia (ATP) necessária à invasão dos mamíferos por este parasita. Este organelo é constituído por enzimas glicolíticas e está presente em todos os tripanossomatídeos (Vishal et al., 2017). Embora o processo de glicólise ocorra no citosol, estes protozoários têm necessidade de compartimentalizar as sete primeiras enzimas da via glicolítica por importação das mesmas a partir do citosol. A importação destas enzimas para o glicossoma, permite aos tripanossomas um controlo mais eficiente da metabolização de glicose e por consequência da produção de ATP. Sabe-se que a não compartimentalização destas enzimas no glicossoma resulta na fosforilação descontrolada da glicose, que por sua vez vai promover a acumulação de metabolitos de glucose a níveis tóxicos e, concomitantemente, esgota os níveis celulares de ATP, conduzindo à morte dos parasitas (Banerjee et al., 2017; Vishal et al., 2017). Para além disso, os glicossomas também abrigam outras vias metabólicas essenciais, como o resgate de purinas, a biossíntese de pirimidina, a biossíntese de açúcar-nucleotídico, a via das pentoses fosfato e a defesa contra o stress oxidativo. Estudos já realizados verificaram que se forem utilizados inibidores de proteínas de importação que promovem a importação de enzimas glicolíticas para o glicossoma, o parasita não sobrevive (Banerjee et al., 2017, Vishal et al., 2017).

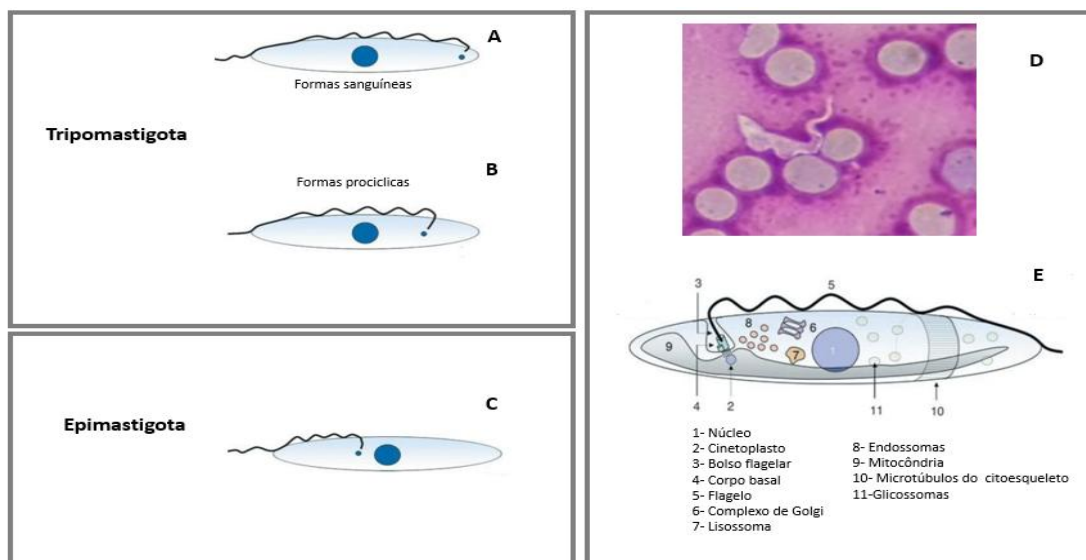


Figura 1 - Representação esquemática das formas morfológicas de *Trypanosoma brucei*. **A e B** – Forma tripomastigota; **C** – Forma epimastigota; **D** – Foto uma gota espessa resultante da infecção de murganho com *T. b. brucei*; **E**-Componentes estruturais de tripanossoma (adaptada de Matthews, 2005).

1.1.3. Ciclo de Vida de *Trypanosoma brucei*

O ciclo de vida de *Trypanosoma brucei* compreende duas fases, a fase no vetor e a fase no hospedeiro mamífero (Kennedy 2013). A infecção do hospedeiro começa com a introdução da forma metacíclica do parasita pela mosca tsé-tsé durante a refeição sanguínea (Fig. 2). Imediatamente após a deposição no hospedeiro mamífero, os parasitas metacíclicos iniciam o processo de multiplicação exatamente no local onde ocorreu a inoculação pelo vetor. Posteriormente, os parasitas migram da epiderme para a corrente sanguínea onde continuam a multiplicar-se (Kennedy 2013). Uma vez atingida a corrente sanguínea, os parasitas diferenciam-se na forma sanguínea parasitária (*bloodstream forms*, BSFs) ou tripomastigota. Esta forma do parasita encontra-se pré-adaptada ao ambiente químico e metabólico existente no vetor (mosca tsé-tsé). A fase vetorial recomeça na mosca tsé-tsé após a refeição sanguínea no hospedeiro infetado, com a ingestão das formas BSFs. No intestino médio do vetor, os tripanossomas diferenciam-se na forma procíclica e multiplicam-se por divisão binária (Kennedy 2013). Algumas destas formas procíclicas transformam-se em formas proventriculares que migram para as glândulas salivares do vetor. Nas glândulas salivares diferenciam-se na forma epimastigota e após uma série de divisões celulares passam a formas metacíclicas infecciosas. Estas últimas formas morfológicas do parasita, pré-adaptadas à vida na corrente sanguínea de mamíferos, são injetadas no mamífero durante uma nova refeição sanguínea da *Glossina*, completando assim o ciclo de vida do parasita (Kennedy 2013).

É ainda importante salientar que estudos recentes vieram demonstrar que este parasita também pode residir na pele e nos tecidos adiposos. Podendo até existir maior densidade de parasitas na pele do que no sangue (Tanowitz et al., 2016; Trindade et al., 2016). Assim sendo, pode-se colocar a hipótese de que a mosca tsé-tsé quando efetua uma refeição sanguínea pode estar também a assimilar parasitas através da pele, constituindo a pele uma espécie de reservatório “escondido” da infecção. Isto pode ainda ter como eventual consequência a existência de indivíduos infetados assintomáticos com capacidade de transmitir o parasita, funcionando como reservatórios do parasita (Tanowitz et al., 2016; Trindade et al., 2016).

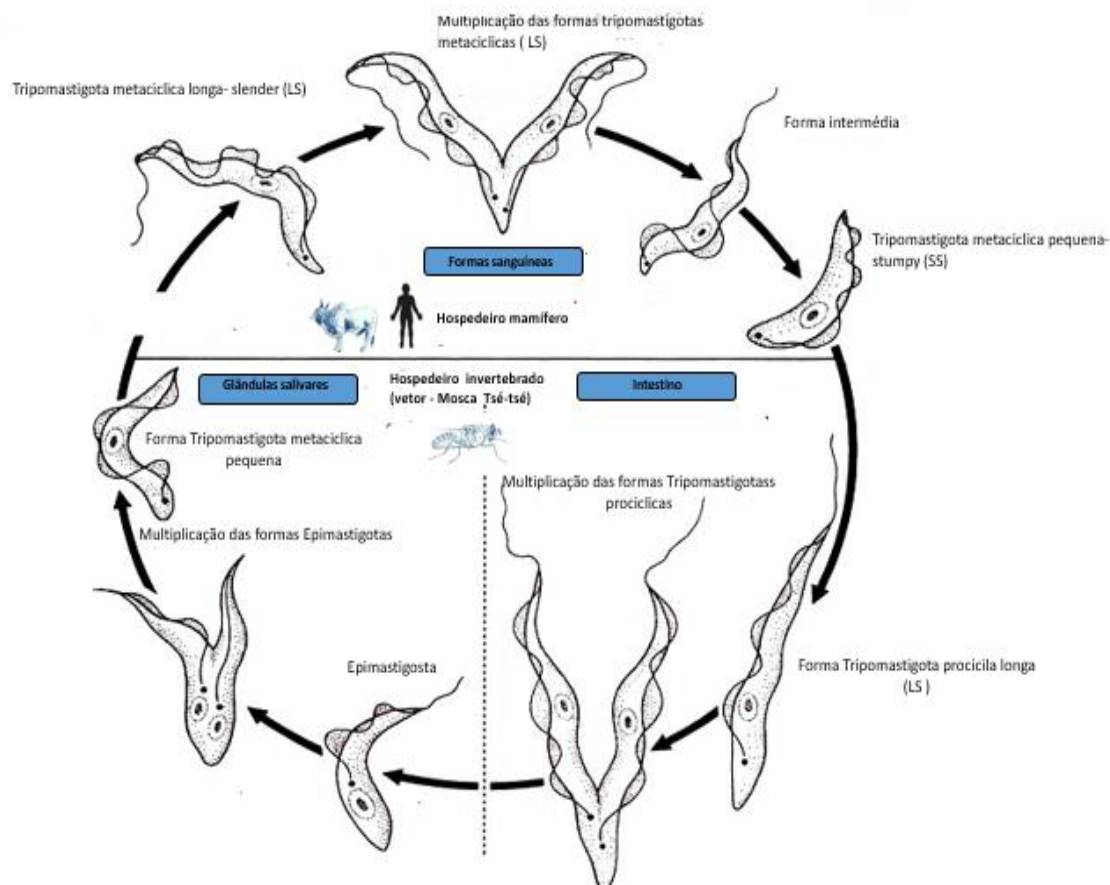


Figura 2- Ciclo de vida de *Trypanosoma brucei* (adaptado de Michael et al., 2011).

1.1.4. Vetor - A Mosca Tsé-Tsé

Os tripanossomas africanos infetam os seus hospedeiros através da picada de moscas do género *Glossina* pertencentes à família Glossinidae, conhecidas como moscas tsé-tsé (Steverding 2008). Estas moscas não põem ovos, mas sim larvas, e efetuam a sua postura diretamente no solo. Após a postura, as larvas enterram-se diretamente no solo e poucas horas depois passam para a fase de pupas, que é uma forma intermédia entre a larva e o inseto adulto. Cerca de seis semanas após a postura, as pupas originam insetos adultos capazes de transmitir tripanossomas (Steverding 2008). As glossinas são endémicas da África subsaariana onde os tripanossomas infetam o gado e os seres humanos (Torr & Vale 2015). A transmissão das duas subespécies infecciosas de tripanossomas humanos encontra-se intimamente associado à presença destas moscas e

como tal, o controlo das *Glossinas* foi considerado uma das medidas preventivas de maior importância (Steverding 2008; Barrett & Croft 2012).

1.1.5. Tripanossomose Humana Africana (HAT)

HAT ou doença do sono é causada por *Trypanosoma brucei gambiense* (África ocidental e central) e por *Trypanosoma brucei rhodesiense* (leste e sul da África) (Lundkvist et al., 2004).

Quando comparada com a HAT causada por *T. b. gambiense*, a HAT originada por *T. b. rhodesiense* é menos prevalente, no entanto é considerada a forma mais aguda e letal da doença (Vincendeau & Bouteille, 2006). A doença do sono afeta principalmente comunidades rurais onde as condições de saneamento e acesso a medicamentos são muito reduzidas.

Em geral, a doença é caracterizada por dois estádios: o estadio hemolinfático precoce, onde os parasitas proliferam no sangue e no sistema linfático e o estadio tardio caracterizado pelo desenvolvimento de meningoencefalite, decorrente da migração dos parasitas através da barreira hematoencefálica e a sua proliferação no líquido cefalorraquidiano, que invariavelmente resulta na morte do doente (Lundkvist et al., 2004, Vincendeau & Bouteille, 2006).

No entanto, é importante mencionar que nos últimos anos, vários estudos revelaram que a HAT nem sempre é letal e que tanto a infeção por *T. b. gambiense*, como a infeção por *T. b. rhodesiense* pode originar uma situação de doença crónica e até mesmo assintomática (Jamonneau et al., 2004, 2012). Nestas situações específicas de não ocorrência de mortalidade e/ou ausência de sintomas é importante ter em consideração as características moleculares e genéticas presentes, que possibilitam que determinados indivíduos sejam resistentes à HAT (Ponte-Sucre, 2016). De acordo com relatórios recentes da OMS, a incidência de HAT tem vindo a decair, ocorrendo anualmente menos de 10.000 casos (Kennedy, 2013, Keating et al., 2015). Contudo, para projetar futuras estratégias de controlo desta parasitose é importante ter em linha de conta as interações entre o parasita e o hospedeiro.

A HAT provocada por *T. b. gambiense* é uma doença predominantemente antroponótica, isto é, que tem menor dependência dos reservatórios animais, mas que constitui cerca de 98% dos casos de HAT relatados. Caracteriza-se essencialmente por uma evolução crónica da doença em que o estadio tardio da meningoencefalite é alcançado meses ou mesmo anos após a infeção (Kennedy, 2013).

Por outro lado, a HAT provocada por *T. b. rhodesiense* é uma doença zoonótica que afeta principalmente animais (gado e animais selvagem), sendo os humanos apenas infetados acidentalmente. Desta forma, constitui apenas 2% dos casos de HAT relatados, porém, as infeções características são agudas e progridem rapidamente (semanas após a infeção) para a fase de meningoencefalia tardia. A progressão desta fase da doença é extremamente difícil de reverter (Kennedy, 2013).

1.1.6. Tripanossomose Animal Africana (AT)

A tripanossomose animal africana (AT), também conhecida como Nagana, é uma segunda forma de tripanossomose que afeta a África subsaariana. É principalmente causada por *T. congolense*, *T. vivax* e, em menor grau, por *T. brucei* (Babokhov et al., 2013).

A infeção por *T. congolense* constitui um importante constrangimento para a produção pecuária e continua a ser a principal causa de morbilidade e mortalidade do gado na África subsaariana (Babokhov et al., 2013). O impacto económico derivado desta infeção é enorme. O gado sucumbe à doença principalmente devido a anemia induzida ou por complicações decorrentes de infeções secundárias e oportunistas (Kennedy, 2013). A progressão desta infeção vai causando o enfraquecimento dos animais, impedindo o seu uso como animais de trabalho na agricultura ou na produção de alimentos (Babokhov et al., 2013; Kennedy, 2013).

Estima-se que a AT represente uma perda anual de cerca de 5 milhões de dólares, e que anualmente sejam investidos pelo menos 30 milhões de dólares em tratamentos de profilaxia para evitar e controlar a tripanossomose no gado (Babokhov et al., 2013). De fato, o impacto da AT nas áreas afetadas é o resultado combinado dos fatores ambientais, dos constrangimentos políticos, do desenvolvimento sociocultural, da estrutura e densidade da fauna entomológica e do investimento disponibilizado para a

pecuária (Babokhov et al., 2013). Deste modo, a instabilidade e fragilidade política muito frequente nas áreas endêmicas de tripanossomose africana comprometem a eficiência das estratégias de intervenção controladas e, posteriormente, desencoraja a comercialização e o investimento em estratégias de controlo (Babokhov et al., 2013; Kennedy, 2013).

1.1.7. Terapêutica dirigida à AT e à HAT

De um modo geral, as empresas privadas são menos propensas a investir na descoberta e no desenvolvimento de fármacos contra doenças que afetam as populações mais pobres, e portanto com menor capacidade económica para adquirir a medicação, escoar os produtos e estimular o desenvolvimento de medicação mais eficiente e menos tóxica. Para além disso, o facto de os animais selvagens funcionarem como reservatório do parasita dificulta bastante o controlo da doença. Estes dois fatores em conjunto culminam no uso inapropriado dos medicamentos disponíveis, favorecendo o aparecimento de resistência aos medicamentos já existentes (Kennedy, 2013; Geiger et al., 2016).

Até agora não existe uma vacina aplicável, sendo a quimioterapia a única estratégia disponível para tratar esta doença. Porém, os fármacos existentes têm revelado um nível elevado de toxicidade (Kennedy, 2013; Geiger et al., 2016).

Os fármacos disponíveis têm como alvo organelos específicos e determinadas vias metabólicas do parasita, como é o caso do glicossoma e do cinetoplasto que não existem nas células dos hospedeiros mamíferos (Malvy & Chappuis, 2011; Kennedy, 2013; Keating et al., 2015).

No entanto ao contrário do que acontece com a HAT, onde a terapia combinada nifurtimox-eflornitina é o tratamento preferencial de primeira linha para doença em estágio tardio (Malvy & Chappuis, 2011), atualmente não são utilizadas combinações de fármacos para AT (Kennedy, 2013). Em vez disso é recomendado, o uso alternado de compostos, particularmente de diminazeno e de isometamídia, que têm baixo risco de desencadear resistência cruzada.

Outro fator que impede o controlo ou a erradicação da tripanossomose é o diagnóstico ineficiente da infeção. Até à data, o diagnóstico da doença é efetuado pela identificação do parasita através de técnicas de microscopia. Apenas para HAT causada

por *T. b. gambiense* existem ferramentas de monitorização para deteção da exposição ao parasita e para determinação do estadio da doença (Giordani et al., 2016). A melhoria do diagnóstico laboratorial, de modo a incluir a identificação da fase da doença e de métodos de triagem precoce são desafios que persistem e que se fossem ultrapassados evitariam o tratamento tardio da doença.

O diagnóstico é frequentemente dificultado devido à falta de valor preditivo positivo das técnicas existentes aplicáveis ao campo e ao fato de a deteção baseada em anticorpos não possuir sensibilidade para diferenciar entre infeções ativas ou passadas (Giordani et al., 2016). Recentemente, Field et al. (2017) realizaram ensaios clínicos com um composto químico, o fexinidazol, para ser utilizado como fármaco em HAT. Estes ensaios estão agora na fase III de desenvolvimento.

1.1.8. Bioquímica de Tripanossomas Africanos

Todos os organismos vivos utilizam o ATP (adenosina trifosfato) como fonte de energia celular. A produção de ATP é conseguida essencialmente pela oxidação de hidratos de carbono através da via da glicólise e do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA ou ciclo de Krebs) (Megha et al., 2016). Como já foi referido no caso dos Tripanossomas existe uma necessidade crucial no que respeita ao controlo da via da glicólise e consequente produção de ATP e por isso estes parasitas recorrem ao glicossoma. Sabe-se também que uma perturbação ao nível da via metabólica dos glicossomas provocada pela inibição da importação das proteínas glicossomais não permite a sobrevivência do parasita e que por isso este organelo tem sido alvo de diversos estudos, utilizando várias drogas inibitórias da importação das proteínas glicossomais. No entanto a existência deste organelo em tripanossomas não é a única particularidade do seu metabolismo oxidativo.

Devido ao seu ciclo de vida heterogénico, o tripanossoma tem de sobreviver e proliferar em ambientes muito diversos em diferentes fases do seu ciclo biológico. Na corrente sanguínea dos mamíferos, por exemplo, existe abundância de oxigénio e glicose o que não se verifica no intestino ou na hemolinfa do inseto (Fenn et al., 2007). Esta alteração de ambientes influencia o número de reações de glicólise e do ciclo TCA que podem ser realizadas e, consequentemente, também interfere no funcionamento de organelos como o cinetoplasto, mitocôndria e glicossomas (Brian et al., 2017).

As formas de *T. brucei* do intestino do inseto utilizam dois processos distintos para a obtenção de ATP, a respiração aeróbia e o catabolismo da Prolina na ausência de glicose. A glicose existe em muito baixa concentração no intestino médio do vetor, uma vez que é rapidamente metabolizada pela mosca. No entanto, a prolina existe em grande abundância no intestino médio do vetor. Assim, o tripanossoma utiliza a prolina como fonte de carbono para promover a produção de succinato, piruvato, acetato e dióxido de carbono (Federica et al., 2016; Brian et al., 2017).

No que respeita ao processo de respiração, embora este não seja o processo maioritariamente observado no intestino médio do vetor, sabe-se que este parasita apresentam todas as enzimas que participam no ciclo TCA e na glicólise (Brian et al., 2017). Este facto não é de todo surpreendente, pois os nutrientes não são abundantes no intestino do inseto (Vickerman et al., 1988). No entanto, existe um facto surpreendente na composição de uma das moléculas que integra o metabolismo oxidativo dos tripanossomas. Isto é, na maioria dos organismos que utilizam fosforilação oxidativa, a produção de ATP é sensível ao cianeto porque os citocromos a/a₃ (componentes do citocromo C) apresentam grande afinidade para reagirem com o cianeto, ficando incapacitados de transferir os eletrões para o oxigénio. No entanto, nas formas intestinais dos tripanossomas a fosforilação oxidativa é apenas parcialmente sensível ao cianeto (Federica et al., 2016). Ou seja, os citocromos a/a₃ mantém a sensibilidade ao cianeto, mas este parasita possui um citocromo adicional, o citocromo O que é insensível ao cianeto. Porém, pouco se sabe sobre o sistema do citocromo O (Anna et al., 2015; Federica et al., 2016).

As formas de *T. brucei* da corrente sanguínea dos mamíferos usam essencialmente a glicólise como via de obtenção de ATP porque existem muitos nutrientes disponíveis. No entanto, a glicólise produz muito menos ATP do que o ciclo TCA. Contudo, a respiração do parasita é cerca de 50 vezes mais intensa quando comparada com a respiração das células de mamíferos (Anna et al., 2015). Por isso, *T. brucei* usa 10 vezes mais combustível quando se encontra no hospedeiro mamífero do que quando está no intestino do inseto (Anna et al., 2015). Para além disso, como as BSFs excretam apenas o piruvato resultante da glicólise e não recorrem ao ciclo do TCA, possuem um metabolismo de fosfato de dihidroxiacetona que constitui uma forma alternativa de converter o NADH (forma reduzida do dinucleótido de nicotinamida e

adenina) em NAD^+ (forma oxidada do NADH) (Anna et al., 2015). Neste sistema aeróbico, o consumo de oxigénio é insensível ao CN, portanto o parasita não necessita de utilizar o mecanismo usual do citocromo. Em vez disso, utiliza a oxidase de glicerofosfato que permite manter o NAD oxidado. A vantagem de manter o NAD oxidado sem que seja necessário a ação intermediária dos citocromos é que permite que os eletrões provenientes da oxidação do NAD fosforilem instantaneamente as moléculas de ADP, originando a produção de ATP. Este sistema é o alvo de dois fármacos tripanocidas: o ácido sulfónico (suramina, $\text{C}_{51}\text{H}_{40}\text{N}_6\text{O}_{23}\text{S}_6$) e o ácido salicil-hidroxâmico (Federica et al., 2016).

1.1.9. Interação entre o Parasita e o Hospedeiro

Como já foi referido neste trabalho, os tripanossomas africanos têm um ciclo de vida complexo e heterogénico, alternando entre o intestino do vetor da mosca tsé-tsé e o sangue/tecidos do hospedeiro mamífero, o que determina que o parasita passe através de diferentes estadios de desenvolvimento (Michael et al., 2011). Para se adaptarem e sobreviverem aos diferentes ambientes, os tripanossomas sofrem alterações essenciais ao nível da morfologia e do metabolismo energético mas também apresentam importantes alterações na sua expressão proteica, em particular nas proteínas que integram o revestimento superficial (Paulnock & Collier, 2001, Paulnock et al., 2010).

Na corrente sanguínea do hospedeiro mamífero, subsistem as BSFs ou tripomastigotas que são ingeridas pelas moscas tsé-tsé durante uma refeição de sanguínea, e consequentemente vão diferenciar-se em formas próclicas no intestino médio do inseto. Em seguida, eles migram para a proboscis (partes da boca) onde se diferenciam em epimastigotas e, finalmente, em formas metacíclicas (*metacyclic forms*, MCFs) infecciosas que podem ser transmitidas para um novo hospedeiro mamífero durante uma nova refeição de sanguínea. Embora no vetor, *T. brucei* e *T. congolense* tenham um ciclo de vida semelhante, apresentam diferenças nos estadios de desenvolvimento. A produção de MCFs infecciosas de *T. congolense* é conseguida no proboscis do vetor, enquanto as MCFs infecciosas de *T. brucei* ocorrem nas glândulas salivares (Michael et al., 2011). No hospedeiro mamífero, *T. congolense* é um parasita estritamente intravascular que estabelece ligações com os eritrócitos circulantes e com as células endoteliais por intermédio do flagelo, causando dano às células no local de adesão (Paulnock et al.,

2010). Em contraste, *T. brucei* pode atravessar os vasos sanguíneos e invadir os tecidos, provocando lesões graves (Brian et al., 2017). Estes dois mecanismos de invasão implicam certamente diferenças relevantes nos mecanismos de virulência das diferentes espécies de *Trypanosoma* e tem consequências importantes na patogenia da doença (Steverding 2008). Além disso, *T. congolense* existe estritamente como forma slender (*long slender*, LS), enquanto *T. brucei* é pleomórfico, podendo exibir uma forma LS e uma forma stumpy (*short stumpy*, SS) que é pré-adaptada para a transmissão ao vetor (Michael et al., 2011). A capacidade de diferenciação pleomórfica de *T. brucei* tem consequências importantes no controlo da parasitemia, porque aumenta o tempo de sobrevivência do parasita na corrente sanguínea do hospedeiro, incrementando a probabilidade de ocorrer transmissão bem-sucedida dos tripanossomas para um novo hospedeiro (Steverding et al., 2008; Michael et al., 2011). Ambas as formas LS e SS são revestidas por uma densa camada glicoproteica. A constituição das glicoproteínas (*variavel surface glycoproteins*, VSG) que constituem esta camada sofrem variações periódicas, protegendo o parasita da resposta imunitária inata e adaptativa do hospedeiro mamífero (Magez et al., 2008).

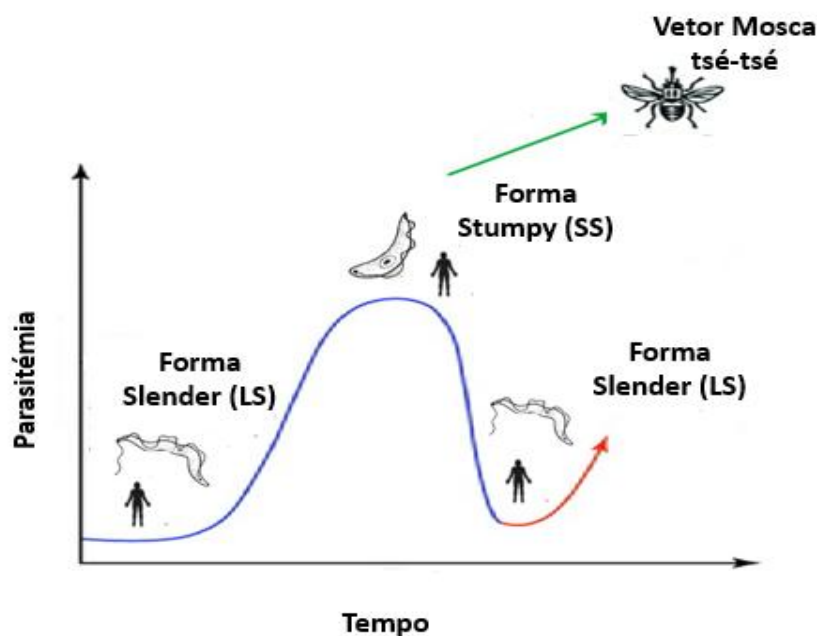


Figura 3- Esquema representativo da diferenciação das diferentes formas LS e SS de tripomastigotas ao longo do tempo (adaptado de Richard et al., 2017)

De notar que no vetor a composição membranar externa dos parasitas é constituída apenas por uma camada de prociclina e unicamente quando se diferenciam em MCFs é que adquirem o revestimento VSG (Magez et al., 2008).

1.2. Resposta Imunitária vs. Tripanossomas

O sistema imunitário dos mamíferos é constituído por dois tipos de resposta imunitária: resposta inata e resposta específica ou adquirida. Em conjunto estas duas respostas imunitárias são responsáveis pelo reconhecimento de agentes patogénicos e consequente inativação ou eliminação. Após contacto inicial com um agente patogénico, o sistema imunitário dos mamíferos tem ainda capacidade de adquirir memória imunitária que possibilita a proteção imunitária mais rápida e eficiente no próximo contacto com o mesmo agente patogénico (ou com o mesmo antígeno) (Luckheeram et al., 2012).

Do ponto de vista do parasita é muito importante que consiga induzir uma resposta imunitária no hospedeiro que não seja suficientemente forte para o eliminar na totalidade, mas que seja suficientemente intensa para diminuir a parasitémia para níveis que não sejam fatais para o hospedeiro. É este equilíbrio entre o parasita e o sistema imunitário do hospedeiro que vai permitir ao parasita perpetuar a sua existência e assegurar a sobrevivência do hospedeiro, completando o seu ciclo de vida (Stijemans et al., 2007).

Os tripanossomas são revestidos por uma superfície proteica bastante densa que é maioritariamente uma glicoproteína de superfície variável (VSG). Estes péptidos são homodímeros com cerca de 12-15 nm e encontram-se ligados à membrana através de um componente designado por glicosilfosfatidilinositol (*Glycosylinositolphosphate*, GPI) (Namangala et al., 2011; Horne et al., 2014). Estes homodímeros são reconhecidos pelos recetores de padrões moleculares (*Pattern-recognition receptors*, PPRs) presentes nas células apresentadoras de antígeno (*Antigen-presenting cells*, APC) (Paulnock et al., 2010).

1.2.1. Resposta imunitária inata

Diversos estudos sugerem que a capacidade do parasita em regular a resposta imunitária inata é crucial para a progressão da infecção e desenvolvimento da tripanossomose (Harris et al., 2007). A supressão da resposta imunitária celular detetada em hospedeiros bovinos, murinos e em seres humanos, reconhecida como uma característica geral da tripanossomose, permite ao parasita evadir-se aos mecanismos de defesa do hospedeiro. Os parasitas estão equipados com um conjunto de moléculas e mecanismos capazes de modular a resposta imunitária inicial do hospedeiro assegurando o estabelecimento da infecção.

A resposta imunitária inata é a primeira linha de defesa do hospedeiro, o que significa que, na presença de um agente patogénico, a sua função é essencial para o reconhecimento e desencadeamento precoce de uma resposta pró-inflamatória.

Esta resposta não é específica e é caracterizada pelo reconhecimento de moléculas do agente patogénico (*Pathogen-associated molecular pattern, PAMPs*), que são estruturas conservadas presentes na superfície de diferentes organismos. As PAMPs são reconhecidos por recetores existentes nas células do hospedeiro que têm a capacidade de reconhecer os PPRs. Consequentemente, este reconhecimento é acompanhado pela ativação da resposta imunitária inata que por sua vez vai ativar os linfócitos (Mogensen et al., 2009).

Os constituintes da resposta imunitária inata incluem a barreira epitelial da pele, o sistema do complemento, macrófagos, células natural killer (NK) e células dendríticas (DC) (Mogensen, 2009). Macrófagos e DCs encontram-se em tecidos não linfóides, mas são capazes de migrar através da linfa ou da corrente sanguínea para os tecidos linfóides, ativando a resposta imunitária específica. As células fagocitárias, em particular os macrófagos, têm a capacidade de endocitar os agentes patogénicos e apresentar péptidos do antígeno na sua superfície celular para que seja reconhecidos pelas células T através do complexo maior de histocompatibilidade (*Major histocompatibility complex, MHC*). São por isso, designadas por células APC (Chaplin et al., 2010; Geiger et al., 2016).

Para além disso, a ativação da via do complemento desempenha um papel fundamental na primeira linha de defesa do hospedeiro. O sistema de complemento é composto por proteínas de superfície celular e do plasma e pode ser ativado através de três vias diferentes: Via clássica (CPT); Via alternativa (APt) e Via da lectina (LPt)

(Chaplin et al., 2010). Quando estas vias são ativadas, são produzidos diversos componentes efetores (Joiner et al., 1988; Noris et al., 2013; Geiger et al., 2016): (i) anafilatoxinas (C3a e C5a) que são moléculas pró-inflamatórias capazes de atrair e ativar linfócitos; (ii) opsoninas (C3b, iC3b e C3d) que se ligam covalentemente à superfície alvo para permitir o transporte e eliminação do antígeno e (iii) a constituição de um complexo (MAC) que degrada a membrana do parasita, promovendo a morte celular.

Da mesma forma, as células *natural killer* (NK) desempenham um papel crítico na imunidade inata devido ao seu efeito lítico em parasitas extracelulares. As NK são células linfocíticas granulares que são capazes de sintetizar quimiocinas e consequentemente, iniciar uma resposta inflamatória por secreção de interferão (IFN) γ e fator de necrose tumoral (TNF) α (Mogensen et al., 2009), estabelecendo assim uma ponte entre a resposta imunitária inata e a resposta imunitária adquirida.

1.2.2. Resposta imunitária adquirida.

Ao contrário da resposta inata, a resposta imune adquirida (ou adaptativa) é específica para o agente patogénico. É mediada por linfócitos T e linfócitos B (Luckheeram et al., 2012; Rock et al., 2016).

As células T são responsáveis pela produção de citocinas e dividem-se em células T CD4⁺ ou células T auxiliares (Th) e em células T CD8⁺ ou células T citotóxicas (Chaplin, 2010).

As células T não apresentam capacidade por si só de reconhecerem os agentes patogénicos. É necessário que os antígenos sejam apresentados via as moléculas do MHC. Na sua superfície celular, as células T têm recetores (*T cell receptors*, TCR) que se ligam às moléculas de MHC complexadas com o antígeno dos agentes patogénicos, ficando ativadas. As moléculas de MHC de classe I (MHCI) apresentam às células T CD8⁺ e as moléculas de classe II (MHCII) apresentam às células T CD4⁺ (Roche & Furuta 2015; Rock et al., 2016).

Os antígenos presentes no citosol das células do hospedeiro são apresentados através das MCHI e reconhecidos pelos TCR das células T CD8⁺. Por outro lado, os antígenos internalizados e processados em compartimentos endocíticos são apresentados

através das MCHII e reconhecidos pelos TCR das células TCD4⁺ (Rock et al., 2016; Buus et al., 1987).

As células T CD4⁺ desempenham diferentes funções na resposta imunitária adquirida, incluindo a regulação da atividade dos macrófagos e das células B (Chaplin et al., 2010).

Por sua vez as células T CD8⁺ têm a capacidade de libertar para o meio extracelular proteínas citotóxicas (perforina e granzimas) cujo objetivo é promover a lise celular do parasita (Chaplin et al., 2010). Essas células também podem libertar TNF- α e IFN- γ e, além disso, podem induzir a apoptose das células alvo (Harty et al., 2000).

As células B constituem apenas 15% dos leucócitos e são responsáveis pela produção de anticorpos específicos, também denominados imunoglobulinas (Ig) (Chaplin et al., 2010). Estão descritas cinco classes de anticorpos em mamíferos, IgA, IgD, IgE, IgM, IgG. As IgM são o primeiro anticorpo a ser expresso numa infeção (indicam o início da infeção) e as IgG são os anticorpos mais frequentes na circulação sanguínea (Schroeder et al., 2010).

1.2.3. Infeção por *Trypanosoma*

Durante uma infeção por *Trypanosoma*, as moléculas GPI presentes na superfície celular do tripanossomas sofrem um processo de clivagem que é desencadeado pela ativação da proteína GP-fosfolipase C presente no flagelo do parasita (Paulnock & Collier, 2001, Paulnock et al., 2010, Yadav et al., 2018). Após este processo de clivagem a VSG, outrora ancorada às moléculas de GPI, é libertada da membrana associada a resíduos de glicosilinositolfosfato (GIP) (GIP-sVSG). As GIP-sVSG são rapidamente detetadas pelas células que compõem o sistema imunitário inato do hospedeiro, ativando assim a resposta inata (Paulnock et al., 2010; Yadav et al., 2018).

Os macrófagos e as DCs são as principais células envolvidas na primeira fase da resposta imunitária, exibindo recetores de superfície capazes de identificar o complexo GIP-sVSG (Paulnock et al., 2010). Estudos efetuados demonstraram que os macrófagos são essenciais para iniciar e manter a resposta imunitária contra o tripanossoma, pois a sua ação fagocitária é o principal mecanismo de eliminação dos parasitas da corrente sanguínea do hospedeiro (Namangala, 2012).

A interação com o complexo GIP-sVSG induz os macrófagos a produzir moléculas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-6 (citocinas de tipo I) e óxido nítrico (NO, espécie reativa de oxigênio) (Baral et al., 2010). Este tipo de interação e a consequente indução de moléculas pró-inflamatórias é designado por via de ativação macrofágica do tipo M1 (Fig. 4) (Salmon et al., 2012, De Muylder et al., 2013). Para além das moléculas pró-inflamatórias libertadas pelos macrófagos do tipo M1, verifica-se também, no decorrer de uma infeção por tripanossoma, a libertação precoce de interferão gama (IFN- γ) por células natural killer (NK) e o recrutamento de linfócitos T por macrófagos do tipo M1 (Salmon et al., 2012, De Muylder et al., 2013).

Relativamente às moléculas produzidas por macrófagos M1, foi demonstrado que o TNF- α é responsável pelo estado de inflamação que pode conduzir a meningoencefalite (Magez et al., 2002, Sternberg, 2004). Além disso, também foi proposto que o TNF- α é utilizado pelos tripanossomas para penetrar a barreira hematoencefálica (Enanga et al., 2002).

Estudos com *T. evansi* revelaram que quer o TNF quer o NO não parecem participar no controlo da infeção. No entanto, estudos com *T. brucei* revelaram que o TNF parece participar no controlo da parasitemia (Ponte-Sucre, 2016). Relativamente à IL-6 seu papel ainda está por esclarecer.

Para sustentar o desenvolvimento do primeiro pico (mais proeminente) de parasitemia, algumas moléculas parasitárias são capazes de mediar as respostas pró-inflamatórias (tipo M1) do hospedeiro. A maioria dos estudos efetuados com *T. brucei* identificaram a libertação de adenilato ciclase (AdC) e a cadeia pesada de cinesina (TbKHC-1). A AdC induz as células mieloides a produzirem IL-10 que, por sua vez impedem a produção de TNF, promovendo o estabelecimento da infeção. A TbKHC-1 induz a produção de poliaminas que constituem nutrientes essenciais ao tripanossoma (Salmon et al., 2012, De Muylder et al., 2013), isto é estimulam a diferenciação de macrófagos M2.

Outra particularidade interessante que tem sido estudada é a possibilidade de alguns tripanossomas serem propositadamente fagocitados pelos macrófagos com o intuito de debilitar toda a resposta imunitária inata mediada pela via M1 e preparando o

caminho para o estabelecimento da primeira fase de parasitemia (Salmon et al., 2012, e De Muylder et al., 2013).

No entanto, em animais tripanotolerantes, a predominância na resposta imunitária decore da ativação de macrófagos através da via alternativa M2 (Fig. 4) que implica a produção de ureia e de interleucinas anti-inflamatórias. As principais citocinas que caracterizam a via M2 são a IL-4, IL-10 e IL-13 (Baral et al., 2010). Estas citocinas têm como principal papel a reparação tecidual. Sendo que a IL-4 desempenha um papel fundamental na proliferação e diferenciação de células B (Fargeas et al., 1992; Vincendeau & Bouteille, 2006).

A resposta inflamatória de tipo I é crítica no estadio inicial da infecção e a mudança para a resposta do tipo II desempenha um papel importante no estadio tardio (Baral et al., 2010). Esta alternância entre M1 e M2 ocorre normalmente 4 semanas após a infecção (Namangala et al., 2012). No entanto, o papel de algumas citocinas libertadas durante a progressão da doença não está totalmente esclarecido (Baral et al., 2010).

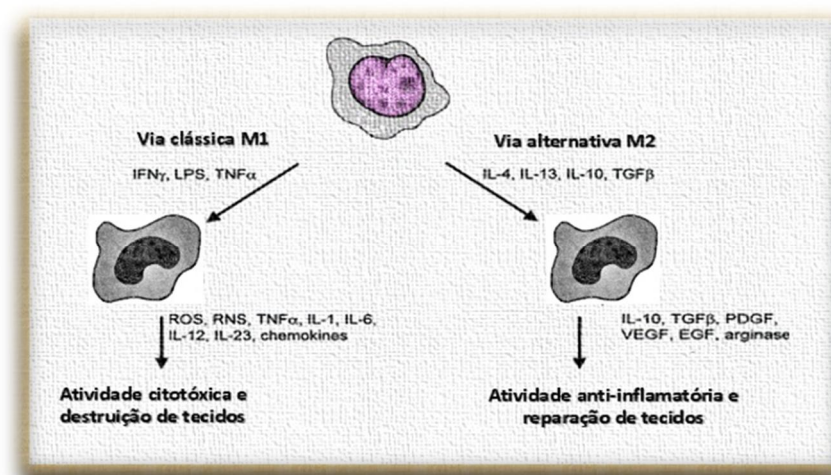


Figura 4 - Esquema representativo das duas vias de ativação de macrófagos, pró-inflamatória (M2) e anti-inflamatória (M1).

Para além destas duas vias de ativação de macrófagos (Fig. 4), o sistema do complemento também tem sido analisado, dada a sua importância como mecanismo de defesa inato. Os tripanossomas desenvolveram mecanismos eficientes para evitar a eliminação mediada pelo complemento. O facto de libertarem grandes quantidades de VSG solúvel (principalmente no pico da parasitemia) que se ligam aos anticorpos

circulantes e consequentemente promovem a adesão dos fatores do complemento, conduzem a um estado de hipocomplementemia (diminuição da concentração plasmática dos componentes do sistema do complemento) que parece favorecer a sobrevivência dos parasitas (Salmon et al., 2012; De Muylder et al., 2013).

Outro fator também concordante com os mecanismos de escape desenvolvidos por estes parasitas está relacionado com as moléculas de complemento solúveis, como C3a e C5a, segregadas durante a fase inicial da infecção. Pensa-se que estas moléculas podem contribuir também para o sucesso destes parasitas, uma vez que, funcionam como agentes quimiotáticos atraindo células fagocitárias para o local da infecção, promovendo a libertação de histamina e por consequência o aumento da permeabilidade vascular, o que vai possibilitar a migração destes parasitas pela corrente sanguínea (De Muylder et al., 2013).

Relativamente à ação das células natural killer (NK), estudos efetuados demonstraram que na primeira etapa da infecção de murganhos por *T. brucei* não se verifica alterações na atividade das células NK. Porém, com a progressão da doença, mais precisamente após o 9º dia, a atividade das células NK é drasticamente reduzida (Vincendeau & Bouteille, 2006).

1.2.4. Mecanismos de Escape de *Trypanosoma* ao Sistema Imunitário do Hospedeiro Mamífero

Para sobreviver como parasitas extracelulares, os tripanossomas africanos desenvolveram mecanismos eficientes de evasão ao sistema imunitário do hospedeiro. De facto, durante milhões de anos de coevolução estes parasitas desenvolveram estratégias para desviar e modelar a resposta imunitária do hospedeiro (Cestari et al., 2018).

É a camada de revestimento proteico variável que numa primeira instância funciona como uma barreira de proteção contra a resposta humoral do hospedeiro, especificamente contra os anticorpos (ACs) produzidos para inativarem os antígenos parasitários (Richard et al., 2017; Cestari et al., 2018).

Estes parasitas apresentam um sistema de variação antigénica, constituído por mais de 1.000 genes diferentes e pseudogenes de VSG que possibilitam recombinações

genéticas capazes de codificar cerca de 10.000 camadas de superfície VSG diferentes durante uma infecção (Fig. 5) (Richard et al., 2017; Tong et al., 2018).

A alternância do revestimento de VSG é efetuada sempre que se verifica uma resposta imunitária acentuada do hospedeiro, permitindo assim reduzir a eficiência dos ACs produzidos e consequentemente assegurar a sobrevivência do parasita e a progressão da infecção (Reis et al., 2018).

A variação genética das VSG é efetuada basicamente de duas formas. Através do controlo da transcrição do gene da VSG ou por substituição do gene, resultando na mutação do próprio gene VSG (Richard et al., 2017; Cestari et al., 2018, Reis et al., 2018; Tong et al., 2018).

As MCFs têm a capacidade de promover a expressão diferencial de VSG, intensificando a transmissão parasitária, enquanto as BSFs usam a expressão diferencial para prolongar a infecção. Curiosamente, as MCFs iniciam a expressão de VSG por cada parasita, ativando aleatoriamente um pequeno subconjunto de genes de VSG metacíclicos (M-VSG) que resulta na produção de uma população heterogénea, pelo que cada tripanossoma expressa um padrão de VSG único (Reis et al., 2018). Por isso, a expressão M-VSG é regulada exclusivamente ao nível da transcrição, enquanto a expressão de VSG da circulação sanguínea é regulada ao nível da transcrição policistronica e da pós-transcrição (Reis et al., 2018).

Os tripanossomas também apresentam uma taxa elevada de endocitose que decorre de uma alta eficiência na aquisição de nutrientes. Ao mesmo tempo, o processo de endocitose possibilita remoção de moléculas de VSG ligadas a ACs e, assim, prevenir ou minimizar a opsonização/eliminação mediada por anticorpos ou mesmo pelo sistema do complemento (Tong et al., 2018). Esta característica dos tripanossomas é benéfica evitando, pelo menos transitoriamente, a eliminação mediada por linfócitos B independente de linfócitos T. Este escape imunitário também dá tempo ao tripanossoma para adquirir a forma tripomastigota, que é a forma mais adaptada à sobrevivência no hospedeiro mamífero. Assim, o processo de variação antigénica proporciona aos parasitas uma importante vantagem imunitária.

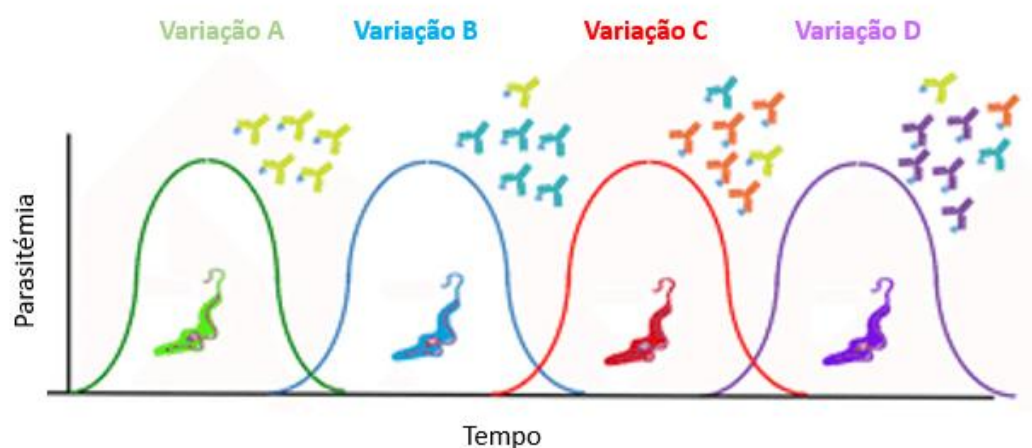


Figura 5 - Esquema representativo da variação da expressão da VSG durante a infecção por *Trypanosoma brucei* (adaptado de Richard et al., 2017).

Para além de toda a panóplia de mecanismos de resposta imunitária do hospedeiro que o tripanossoma tem de ultrapassar para que a infecção progrida, o facto de o parasita ser inoculado pelo vetor também contribui para assegurar o êxito da infecção.

A saliva da mosca tsé-tsé contém componentes capazes de atenuar a resposta inflamatória do hospedeiro, inibindo a libertação de moléculas tripanolíticas, como é o caso do TNF e do NO, favorecendo a permanência e dispersão do parasita no hospedeiro (Baral et al., 2010; Geiger et al., 2016). Apresentam ainda, componentes capazes de desencadear a desgranulação dos mastócitos, que resulta na libertação de histamina e aumento da vasodilatação, permitindo assim a disseminação e migração dos parasitas através da circulação sanguínea (Stijlemans et al., 2007).

1.3. Exossomas

Os exossomas são nanovesículas membranares com um diâmetro de aproximadamente 30-100 nm e são segregados por inúmeros tipos de células para o meio extracelular (Farooqi et al., 2018).

1.3.1. Características e Função dos Exossomas

A génese dos exossomas tem início em vesículas internas do compartimento endossomal, o corpo multivesicular (*multivesicular bodies*, MBVs), que se funde com a membrana plasmática celular, libertando os exossomas para o meio extracelular. Os MBVs formam-se a partir de um processo de invaginação endossomal com integração de proteínas, ácidos nucleicos e lípidos específicos que irão determinar a composição única e atribuir funções específicas aos exossomas que pode variar de acordo com as células em que tiveram origem (Stoorvogel et al. 1991; Willem et al., 2002; Farooqi et al., 2018).

Os exossomas, devido à sua dimensão, são excelentes a transferir proteínas de célula para célula sem que se verifique a necessidade de contato direto entre as células, facilitando as interações moleculares. São altamente enriquecidos em oligómeros (tetrasapaninas) que estão implicados na apresentação antigénica, sinalização e a ativação de células T, motilidade celular e adesão, na formação de complexos com o MHCI e MHCII, com as integrinas e com os co-receptores de células T CD4⁺ e CD8⁺ (Stoorvogel et al., 1991; Willem et al., 2002).

Estudos prévios evidenciaram que os exossomas de mastócitos e células epiteliais intestinais são enriquecidos em MHCII e MHCI. Os exossomas de plaquetas e de células T citotóxicas contêm moléculas específicas, como o fator de von Willebrand (Heijnen et al., 1999).

Embora o papel fisiológico *in vivo* dos exossomas ainda não seja totalmente compreendido pensa-se que participam numa infinidade de processos, incluindo a comunicação extracelular durante a resposta imunitária. Após a ligação às células alvo, os exossomas podem permanecer associados à superfície celular ou podem ser endocitados (Denzer et al., 2000).

Diversos estudos demonstraram que os exossomas afetam uma diversidade de processos biológicos que estão associados à progressão de doenças neurodegenerativas, doenças cardiovasculares e ao cancro, bem como, podem auxiliar os agentes patogénicos na mediação da resposta imunitária do hospedeiro (Harding et al., 1984; Raposo et al., 1996; Escola et al., 1998). Por exemplo, encontra-se descrito que um dos mecanismos de escape de *Leishmania* é a produção de exossomas que transportam a glicoproteína de 63kDa (gp63). A gp63 é integrada nas células hepáticas, inibindo a proteína Dicer1. A Dicer1 é produzida pelas células hepáticas e tem como função regular o processamento

do micro RNA miR-122. O miR-122 é altamente expresso pelas células hepáticas, estando implicado na regulação do metabolismo dos ácidos gordos. Estudos efetuados, em *Leishmania*, demonstraram que quando é efetuado a inibição no processamento do miR-122 e portanto, comprometido o metabolismos dos ácidos gordos nas células hepáticas, verifica-se um aumento do nível da carga parasitária de *Leishmania* (Ghosh et al., 2013).

Outros estudos revelam que durante a malária, os exossomas produzidos pelos glóbulos vermelhos infetados com *Plasmodium*, estavam envolvidas na comunicação celular entre os parasitas, possibilitando ao próprio parasita detetar a sua densidade populacional durante a infeção. Esta informação sobre a densidade populacional permite ao *Plasmodium* mediar o equilíbrio entre a multiplicação assexuada e a produção de gametócitos (Raposo et al., 1996; Zitvogel et al., 1998; Thery et al., 2001).

Os exossomas produzidos durante infeções virais, parasitárias e bacterianas também podem promover ou inibir a imunidade do hospedeiro (Schorey et al., 2015)

1.3.2. Exossomas de *Trypanosoma brucei*

À semelhança de outros organismos, também foi demonstrado que *T. brucei* segrega exossomas (Geiger et al., 2010; Szempruch et al., 2016). Estudos recentes forneceram evidências de que as BSFs de *T. brucei* têm capacidade de produzir nanotubos a partir da membrana flagelar e que estes nanotubos se dissociam para formar nanovesículas extracelulares, os exossomas (Szempruch et al., 2016). Estas nanovesículas incorporam várias proteínas flagelares que funcionam como fatores de virulência, bem como, um tipo de proteína associada à resistência ao soro (*serum resistance associated*, SRA) que protege o parasita dos efeitos nocivos da resposta imunitária do hospedeiro humano (Dror et al., 2017). Sabe-se também que, estes exossomas podem fundir-se com eritrócitos humanos, promovendo a rápida eliminação destas células da corrente sanguínea (Dror et al., 2017).

Outros estudos sugerem que os exossomas afetam a mobilidade social de *T. brucei* (Oberholze et al., 2010; Imhof et al., 2014) e que podem ser usados para confundir a resposta imunitária inata, facilitando a sobrevivência dos parasitas (Szempruch et al., 2016; Dror et al., 2017).

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo principal investigar o efeito dos exossomas produzidos por *T. b. brucei* na imunoativação de macrófagos através dos seguintes objectivos específicos:

- 1- Isolamento de exossomas libertados pelas formas de *T. b. brucei* mantidas em cultura durante diferentes períodos de tempo;
- 2- Analisar o efeito dos exossomas de *T. b. brucei* na atividade de macrófagos de murganho (linha celular macrófago-like P388D1) pela:
 - 2.1. - determinação da diferenciação de macrófagos M1 através da quantificação da produção de óxido nítrico;
 - 2.2. - determinação da diferenciação de macrófagos M2 através da quantificação da produção da ureia;
 - 2.3. - determinação da frequência de macrófagos que expressam MHCI na membrana celular que é uma indicação indireta de apresentação de antígenos às células T CD8⁺;
 - 2.4. - determinação da frequência de macrófagos que expressam MHCII na membrana celular que é uma indicação indireta de apresentação de antígenos às células T CD4⁺;
 - 2.5. - caracterização da densidade de MHCI e MHCII na superfície celular como indicadores indiretos dos níveis de apresentação antigénica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Desenho Experimental

O estudo experimental realizado dividiu-se essencialmente em duas etapas (Fig. 6). Na primeira etapa foram inoculados murganhos com a estirpe de *Trypanosoma brucei* *brucei* G.V.R. 35. Os parasitas sanguíneos foram isolados em meio de cultura e as nanovesículas foram extraídas do meio de cultura recorrendo ao uso do kit Exosome Spin Columns (MW 3000, Invitrogen). As nanovesículas foram caracterizadas por nanotecnologia e microscopia eletrônica de varrimento. Foi também efetuada a avaliação da composição macromolecular das nanovesículas. Na segunda etapa foi analisado o efeito de parasitas viáveis e dos exossomas na modulação da atividade macrofágica, através da quantificação da produção de ureia e óxido nítrico (NO) por testes colorimétricos. A capacidade de macrófagos expostos ao parasita e aos exossomas funcionarem com APC e efetuarem apresentação antigénica foi indiretamente avaliada por citometria de fluxo através da expressão de MHCI e de MHCII.

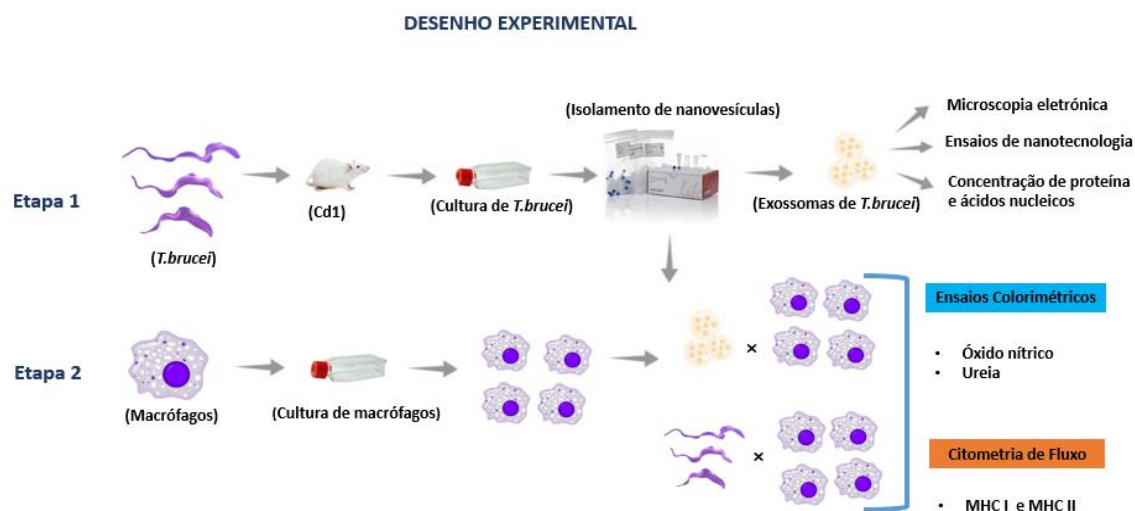


Figura 6 - Esquema representativo do trabalho experimental realizado. A etapa 1 descreve o isolamento de *T. brucei*, a extração de nanovesículas parasitárias e a sua caracterização. A etapa 2 descreve o estudo da ativação macrofágica induzida por parasitas viáveis e por exossomas e a avaliação indireta da possível apresentação antigénica.

3.2. Linha Celular de Macrófagos

A linha celular de macrófagos P388D1 (ATCC, EUA) utilizada neste estudo experimental foi isolada a partir do linfoma de murganho. É considerada uma linha celular de linfoblastos com características de macrófago (*macrophage-like*), com elevada capacidade fagocítica e de expressão de moléculas de MHCII (complexo maior de histocompatibilidade haplótipo H-2^{d/d}) (Campos-Neto et al., 1995).

Para cultivar a linha celular P388D1 foi utilizado meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute culture medium*) 1640 (Lonza, Bélgica) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino *Exofree* (livre de exossomas) (bovine sérum, FBS, Sigma-Aldrich, Alemanha) previamente inativado pelo calor (56°C durante 30 min), 2 mM de L-glutamina (Merck, Alemanha), 50 U.mL⁻¹ de penicilina (Sigma-Aldrich) e 50 µg.mL⁻¹ de estreptomicina (Sigma-Aldrich). Os macrófagos foram cultivados em suspensão, a 37°C em atmosfera húmida com 5% de CO₂. A cada 2 - 3 dias foi adicionado meio novo de modo a manter uma concentração celular de cerca de 2×10^6 macrófagos.mL⁻¹.

3.3. Infecção de murganhos com *Trypanosoma brucei brucei*

Murganhos CD-1 com idades compreendidas entre as cinco e as nove semanas foram mantidos no Biotério do IHMT sob condições climáticas e de nutrição adequadas e de acordo com os requerimentos da União Europeia relativos ao bem-estar dos animais de experiência (*EU Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes*) reconhecidos pela lei nacional (DR DL2010/63/EU e Portaria 113/2013).

A infecção dos murganhos foi realizada por via intraperitoneal com 200 µl de uma solução contendo parasitas da estirpe *Trypanosoma brucei brucei* G.V.R. 35 e 10% de FBS. A infecção foi seguida periodicamente através de observação microscópica de esfregaços e gota espessa de sangue periférico de murganho infetado. Quando foi atingido o primeiro pico de parasitemia (aproximadamente ao fim de 7 dias de infecção), os animais foram sacrificados e retirado todo o sangue por punção cardíaca, em assepsia com auxílio de uma seringa de insulina heparinizada.

3.4. Isolamento e cultura de *T. b. brucei*

Após a colheita, o sangue foi incubado durante 24h a 37°C com o intuito de detetar possíveis contaminações.

Após 24h e verificada a inexistência de contaminações foi adicionado o tampão de lise ACK (cloreto de amónia: 0,15 M NH₄Cl, 1,0 mM KHCO₃, 0,1 mM Na₂EDTA, pH. 7,2) na razão de 1:5. O ACK é um reagente usado para a lise de glóbulos vermelhos. A suspensão foi incubada à temperatura ambiente durante 3 a 5 min e centrifugada a 300 ×g durante 5 min à temperatura ambiente. O sedimento foi descartado e ao sobrenadante foi adicionado 5ml de PBS (solução salina tamponada com fosfato) mantida a 4°C. A suspensão foi novamente centrifugada a 300 ×g durante 5 min a 2 – 8°C. O sobrenadante foi removido e o sedimento foi ressuspensionado em 2 ml de meio Schneider 10% FBS-*Exofree*. As culturas foram incubadas em *T-flask* a 24°C durante 48h, 72h, 96h e 7 dias.

3.5. Isolamento de nanovesículas a partir de culturas de *T. b. brucei*

O isolamento dos exossomas foi efetuado a partir de culturas de *T. b. brucei* com 48h, 72h, 96h e 7 dias de incubação através do kit Exosome Spin Columns. Este kit permite substituir métodos de purificação mais demorados como a ultra centrifugação de longo termo. O kit inclui colunas de centrifugação que contém um gel que após hidratação permite selecionar nanovesículas de pequena dimensão.

As colunas foram hidratadas com 650 µL de PBS, agitadas num vortex para retirar as bolhas de ar e incubadas durante 5 - 15 min à temperatura ambiente. As colunas foram aplicadas a tubos coletores de 2 mL e centrifugadas a 750 ×g durante 2 min à temperatura ambiente para remover o excesso de PBS. Os tubos coletores foram descartados e as amostras (20 – 100 µL) foram colocadas diretamente no centro das colunas colocadas em tubos coletores de 1,5 mL. As colunas foram centrifugadas durante 2 min a 750 ×g à temperatura ambiente. As amostras de nanovesículas foram conservados a -20°C até à sua utilização. As nanovesículas recolhidos foram analisadas por microscopia eletrónica de varrimento e por rastreamento de nanopartículas e a quantidade de proteína e de ácidos nucleicos quantificados.

3.6. Microscopia Eletrônica de Varrimento

A microscopia eletrônica de varrimento (MEV) de alta resolução permite obter imagens da topografia de uma determinada nanopartícula. As imagens topográficas têm uma aparência tridimensional característica e são úteis para avaliar a estrutura superficial e o tamanho das nanovesículas.

Nanovesículas isoladas de culturas de *T. b. brucei* com 72h de incubação foram processados para serem analisados por MEV. A amostra de exossomas foi colocada em lamelas e fixada com gluteraldeído 2,5% em solução tampão de cacodilato de sódio 0,1M pH 7,4, durante 2h a 4°C. As lamelas foram lavadas com tampão de cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,4 para eliminar o fixador (gluteraldeído) e incubadas durante 15 min à temperatura ambiente. Este procedimento foi repetido duas vezes. As amostras foram desidratadas utilizando uma bateria de soluções de etanol com concentração crescente, com início em etanol a 70° até etanol absoluto:

1. Álcool a 70°, 15 min à temperatura ambiente;
2. Álcool a 90°, 15 min à temperatura ambiente;
3. Álcool a 95°, 15 min à temperatura ambiente;
4. Álcool a 100°, 3 passagens de 15 min à temperatura ambiente.

A amostra foi submetida ao ponto crítico e metalizada. Este último procedimento foi gentilmente realizado pela Prof. Doutora Graça Pires. As amostras foram observadas em MEV (MEV Hitachi, SU8010) e as imagens foram adquiridas.

3.7. Ensaio de Nanotecnologia

Para analisar a dimensão e a concentração das nanovesículas presentes nas amostras recorreu-se à análise por rastreamento de nanopartículas (NTA). Esta metodologia permite identificar nanopartículas de 10 – 2000 nm em solução. O ensaio foi realizado pela Empresa ParaLab com recurso ao aparelho NANOSIGHT (NTA 3.2 Dev Build 3.2.16) e teve como objectivo identificar o tamanho e a concentração das nanovesículas presentes em amostras de nanovesículas extraídas de meios de cultura incubadas com *T. b. brucei* durante 48h.

3.8. Produção de óxido nítrico por macrófagos expostos a *T. b. brucei* e a exossomas

O NO produzido pelos macrófagos é resultado da metabolização da L-arginina, um aminoácido essencial, pela enzima NOS2 e o resultado final é a produção de óxido nítrico e citrulina (Fig.7).

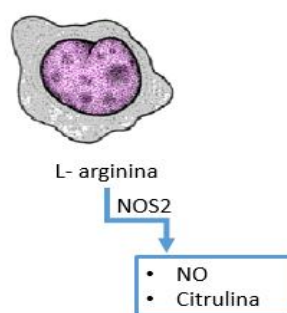


Figura 7 - Via metabólica da arginina (aminoácido essencial) em macrófagos que conduz à produção de óxido nítrico (NO) e de citrulina.

A produção de NO foi quantificada em sobrenadantes de culturas de macrófagos através do kit *Nitrite/Nitrate colorimetric assay* (ABNOVA, Taiwan). Através de um método preciso e simples foi possível estimar a concentração total de nitratos e nitritos. O processo divide-se essencialmente em duas etapas: (i) a conversão de nitrato (NO_3^-) em nitrito (NO_2^-) pela nitrato redutase e (ii) a adição do reagente de Griess que converte o nitrito num cromóforo azo de cor rosa/roxa.

Os macrófagos (6×10^6 células/mL) foram incubados com parasitas viáveis (numa proporção de 1:3) a 37°C em atmosfera húmida com 5% CO_2 e com exossomas ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$) de *T. b. brucei* mantido em cultura durante 48h, 72h, 96h e 7 dias. Ao fim de 6h, 8h, 12h, 18h e 24h de incubação, os sobrenadantes das culturas de macrófagos foram recolhidos. Em paralelo, macrófagos estimulados com PMA ($0,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e macrófagos em repouso (não estimulados) foram utilizados respetivamente como controlo positivo e controlo negativo. O PMA é um ativador da proteína cinase C e induz a produção de ROS.

Para estimar a concentração de nitritos foi construída uma curva padrão com quantidades conhecidas de NO_3^- . Foram efetuadas diluições seriadas de uma solução de $200 \mu\text{M}$ NO_3^- de modo a obter concentrações finais entre $35 \mu\text{M}$ e $0 \mu\text{M}$.

Numa placa de 96 poços de fundo plano foi colocado em triplicado 80µL de sobrenadante das diferentes amostras. As diluições de NO₃⁻ foram também colocadas na placa (padrão). O cofator (10µL) e a enzima nitrato reductase (10µL) previamente reconstituída em tampão de ensaio foram adicionados a cada amostra, incluindo o padrão. A placa foi incubada durante 1h e depois foi adicionado 50µL do reagente de Griess R1, seguido de 50µL do reagente de Griess R2. Após 10 min de incubação à temperatura ambiente, a absorvância foi lida a 570nm num leitor de placas (TRIADTM 1065, DYNEX Technologies, EUA). Foi também realizada a medição do tampão de ensaio (branco). Foi assumido que a intensidade da cor é diretamente proporcional à concentração de NO₂⁻/NO₃⁻ nas amostras. A curva padrão foi gerada e os valores da concentração de NO₂⁻ e NO₃⁻ foram extrapolados a partir da seguinte equação:

$$[\text{Nitrato} + \text{Nitrito}](\mu\text{M}) = (D_{0570\text{nm}} - \text{Declive reta padrão}) \times \text{Vol final amostra} (\mu\text{L}) \times (\text{Fator diluição})$$

Em que DO indica a densidade ótica de cada amostra, o vol final da amostra corresponde a 200µL e o fator de diluição foi 1, uma vez que não foi efetuada qualquer diluição das amostras.

3.9. Produção de ureia por macrófagos expostos a *T. b. brucei* e a exossomas

A ureia produzida pelos macrófagos é resultado da metabolização da L-arginina, um aminoácido essencial, pela enzima arginase e o resultado final é a produção de ureia e ornitina (Fig. 8).

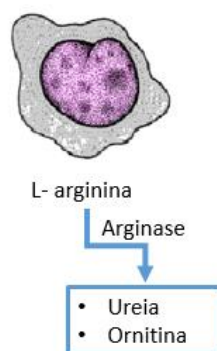


Figura 8 - Via metabólica da arginina (aminoácido essencial) em macrófagos com produção de ureia e ornitina.

A ureia produzida por macrófagos expostos a parasitas viáveis e aos exossomas foi quantificada. Os sobrenadantes das culturas de macrófagos (descritas em 3.8.) foram utilizados para determinar a concentração da ureia através do kit *QuantiChrom™ Urea Assay* (BioAssay Systems, EUA). Este kit utiliza um reagente cromogénico que forma um complexo colorimétrico específico com a ureia. A intensidade da cor (absorvância lida a 450nm) é diretamente proporcional à concentração de ureia na amostra.

Numa placa de 96 poços de fundo plano foram depositados em triplicado 50µL de sobrenadante, 50µL da solução padrão (5mg ureia.dL⁻¹) e 50µL de água (branco). Aos poços foi adicionado 200µL de tampão de ensaio constituído equitativamente por:

Reagente A: (< 0,40% de ácido sulfúrico; < 0,04% de *Brij* 35 e 10,00% de oftalaldeído);

Reagente B: (< 0,08% de difosfato de primaquina; < 0,80% de ácido bórico; 22,00% de ácido sulfúrico e < 0,04% de *Brij* 35).

A placa foi protegida da luz e incubada durante 50 min à temperatura ambiente. A densidade ótica (DO) foi lida a 450nm num leitor de placas.

A concentração de ureia foi posteriormente calculada através da seguinte fórmula:

$$[Ureia](mg.dL^{-1}) = \frac{(DO amostra - DO branco)}{(DO padrão - DO branco)} \times n \times padrão$$

Em que *n* é o fator de diluição das amostras que neste caso é igual a 1, porque as amostras não foram diluídas e o padrão é igual a 5 porque tem uma concentração de ureia de 5 mg.dL⁻¹.

3.10. Expressão de MHCI e MHCII por macrófagos expostos a *T. b. brucei* e a exossomas

A análise de macrófagos que expressam moléculas de MHC foi efetuada por citometria de fluxo. Esta técnica permite analisar individualmente cada célula e apresenta um enorme potencial para a imunofenotipagem e determinação da frequência de células

e partículas (Brown & Witter, 2000). Consiste num processo de análise multi-paramétrica em que as características físicas e químicas de cada célula são determinadas.

Os macrófagos expostos a parasitas viáveis (numa proporção de 1:3) e a exossomas ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$) de *T. b. brucei* por 72h (como descrito em 3.8) foram recolhidas e lavadas com 200 μL de PSB 1 \times a 600 $\times g$ durante 5 min, para retirar vestígios de proteínas presentes no meio de cultura. Ao sedimento, foi adicionado 99 μL de tampão PBS 2% FBS-Exofree. As amostras foram marcadas com anticorpos monoclonais específicos de murganho adicionados a flurocromos (BioLegend, USA) (Tabela 1).

Tabela 1 - Anticorpos monoclonais específicos de murganho, flurocromos e respetivos volumes utilizados na marcação de macrófagos.

Anticorpo monoclonal	Flurocromo	Volume usado (μL)
Anti MHCI (H2kb)	FITC (0,5 mg/mL)	1,64
Anti MHCII (I-A/I-E)	PE (0,2 mg/mL)	4,5

As células foram incubadas em gelo durante 30 min e lavadas com PBS 1 \times a 600 $\times g$ durante 5 min com o intuito de eliminar os anticorpos que não se ligaram especificamente. As células foram fixadas com paraformaldeído 2% durante 20 min em gelo e centrifugadas a 400 $\times g$ a 4°C. Os sedimentos foram ressuspensos em 250 μL de PBS 2% FBS e mantido a 4°C na ausência de luz até à realização da citometria.

Os controlos para a calibração do citómetro e ajuste da fluorescência, assegurando a correta leitura das amostras, foram: células fixadas e não marcadas; células marcadas individualmente com cada um dos anticorpos utilizados e células marcadas com ambos os anticorpos. Os controlos e amostras foram analisados no citómetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences, USA), da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) e os resultados foram analisados com o programa Flowjo V10 (Tree Star Inc., USA).

3.11. Análise de Resultados

Foram utilizados pelo menos triplicados de cada amostra de três experiências independentes. Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente com recurso ao teste não-paramétrico de Wilcoxon para amostras emparelhadas com nível de

significância de 5% ($p < 0,05$). A análise estatística foi realizada no software Graphpad Prism, versão 6.00 para Windows (GraphPad Software, USA).

Os resultados obtidos para os valores de ureia e NO produzidos após a exposição aos diferentes estímulos foram divididos pelos respectivos valores produzidos por macrófagos não estimulados, com o intuito de determinar a produção de *Novo* de ureia e de NO. Por sua vez foi também determinado a taxa de acumulação de ureia produzida de *Novo* por macrófagos expostos aos diferentes estímulos. Foi estabelecida a correlação entre a densidade molecular à superfície dos macrófagos do MHCI e MHCII determinada através da intensidade de fluorescência e a frequência das subpopulações de macrófagos MHCI⁺ e macrófagos MHCII⁺. A regressão linear incluí os dados de controlo negativo (CN) e os dados obtidos durante 72 h de estimulação dos macrófagos com o parasita e com os exossomas iniciais (42h) e tardios (7 dias).

4. RESULTADOS

4.1. *T. b. brucei* emite exossomas

A análise topográfica de nanovesículas isoladas a partir do meio de cultura de tripomastigotas de *T. b. brucei* mantidos durante 24h demonstraram a presença de estruturas vesiculares com tamanhos compreendidos entre 30-100nm (Fig. 9). Estas estruturas vesiculares apresentam aspeto e tamanho compatíveis com exossomas.

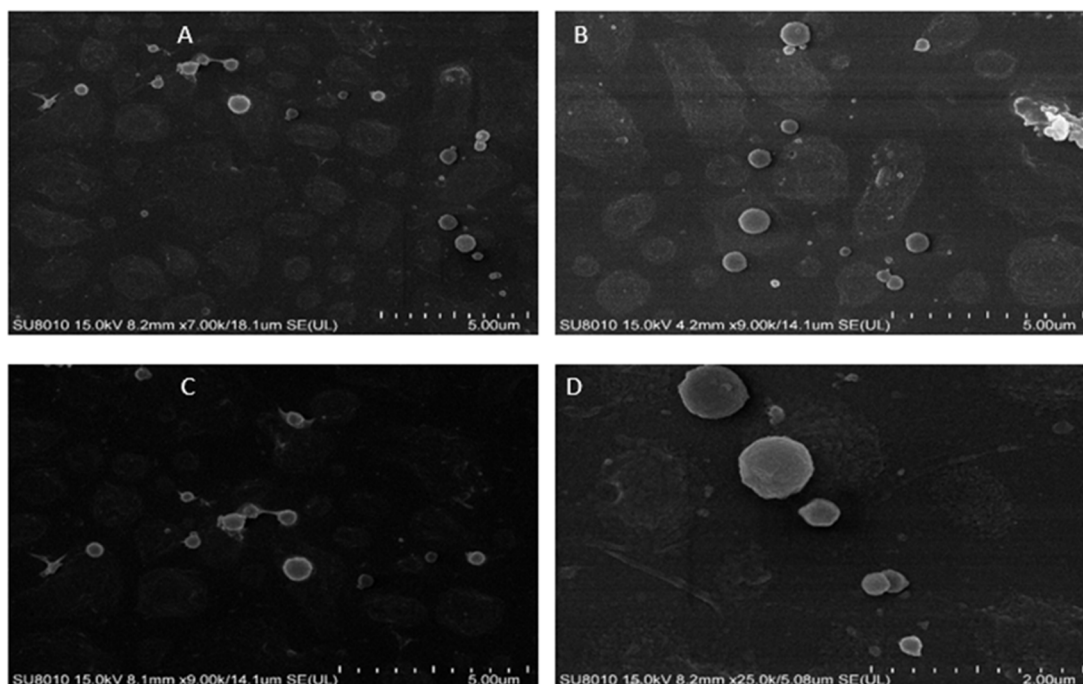


Figura 9 - Topografia de nanovesículas libertadas por *T. b. brucei*. Nanovesículas extraídas do meio de cultura incubado com tripomastigotas durante 48h foram fixadas e metalizadas. As nanovesículas foram observadas por microscopia eletrónica de varrimento de alta resolução e as imagens foram adquiridas com ampliações diferentes. A e D - $\times 900\ 000$; B - $\times 250\ 000$; C - $\times 700\ 000$.

Os resultados obtidos através de estudos nanotecnológicos indicam a existência de partículas com tamanho compreendido entre 30 - 100 nm (Fig. 10) que é compatível com a dimensão descrita para o tamanho dos exossomas, evidenciando novamente a presença destas estruturas vesiculares nas amostras utilizadas. As amostras continham também uma concentração considerável destas partículas atingindo máximos de 2×10^{-3} partículas. μL^{-1} .

No conjunto, estes resultados indicam que a metodologia utilizada permitiu isolar exossomas segregados por *T. b. brucei* para o meio de cultura.

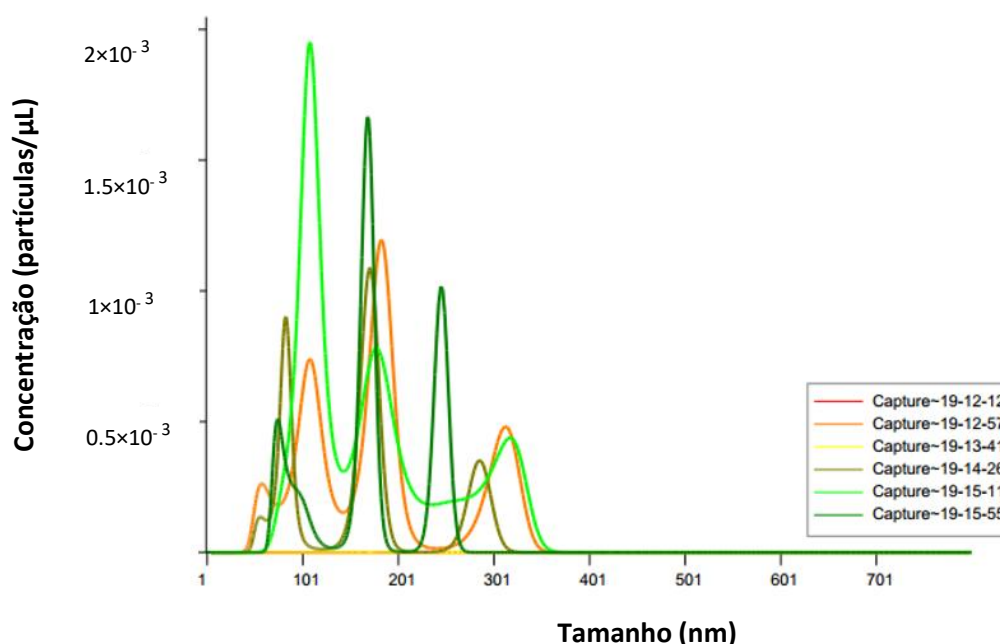


Figura 10 - Dimensão e concentração de nanopartículas libertadas por *T. b. brucei*. As nanovesículas extraídas do meio de cultura incubado com tripomastigotas durante 48h foram analisadas por rastreamento de nanopartículas.

4.2. Os exossomas de *T. b. brucei* são ricos em proteína e RNA

A concentração proteica e de ácidos nucleicos das amostras de exossomas obtidas a partir de culturas de *T. b. brucei* com 48h, 72h, 96h e 7 dias de incubação foi determinada com recurso ao NanoDrop 1000 Spectrophotometer. Os resultados obtidos revelaram a existência de reduzidas quantidades de DNA que variaram entre 0,2724 e 0,4587 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Porém, a concentração de proteínas e de RNA foi mais elevada (Tabela 2). A concentração de RNA variou entre 236,29 e 361,70 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e a concentração proteica variou entre 5107 e 7533 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Fig. 11).

A concentração proteica aumentou progressivamente com o tempo de incubação dos parasitas em meio de cultura (Fig. 12A). Contudo, as concentrações de DNA e RNA evidenciaram estabilidade ao longo de 96h. Ao fim de 7 dias de incubação, os exossomas revelaram aumento considerável da concentração de proteína e de ácidos nucleicos (Fig. 12B e C).

Tabela 2 - Concentração proteica e de DNA e RNA de amostras de exossomas de *T. b. brucei*. Exossomas isolados de meio de cultura com 48h, 72h, 96h e 7 dias de incubação foram utilizados para quantificar proteínas e ácidos nucleicos.

	Proteína ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)		DNA ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)		RNA ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	
	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MÉDIA	DESVIO PADRÃO
EXO 48h	5107	35,28	0,3062	0,018	246,50	20,63
EXO 72h	5820	91,74	0,3176	0,011	252,43	4,51
EXO 96h	5830	15,81	0,2724	0,003	236,29	10,79
EXO 7 dias	7533	43,85	0,4587	0,007	361,70	6,46

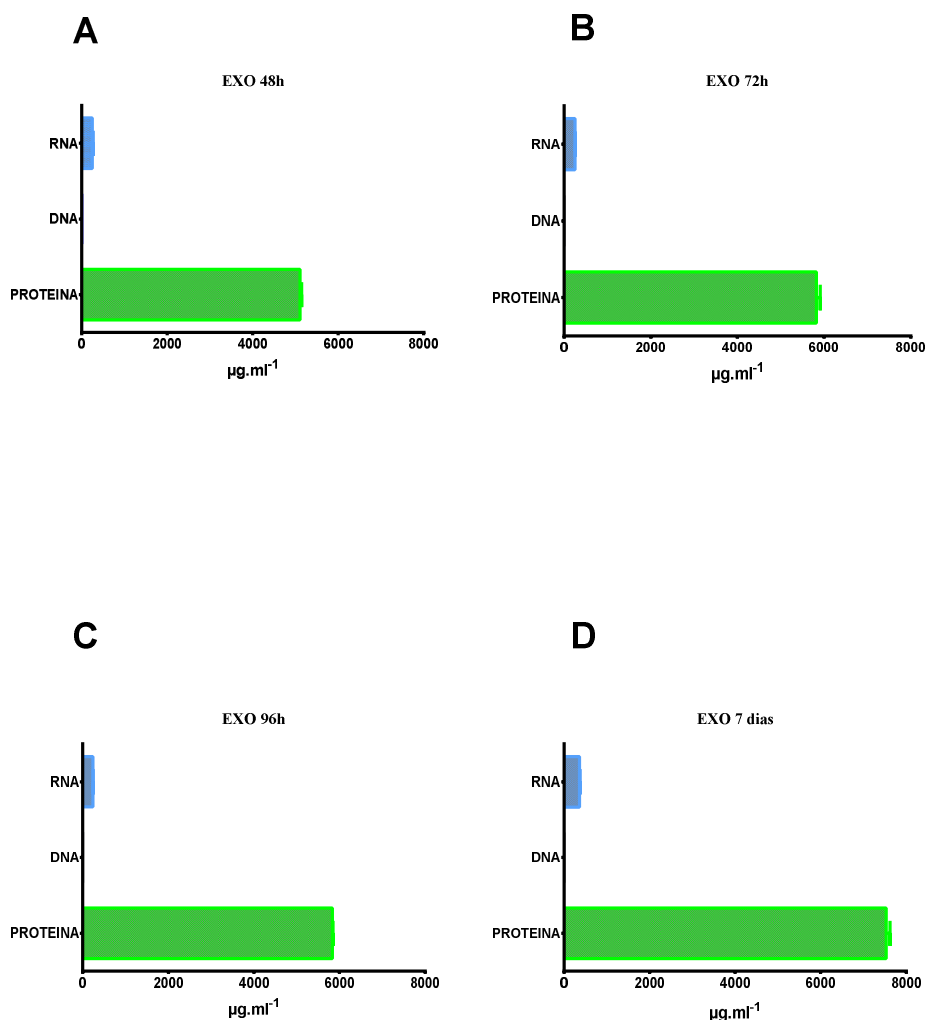


Figura 11 - Representação gráfica dos níveis proteicos, de DNA e RNA de exossomas de *T. b. brucei* ao longo do tempo. Concentração de proteína e ácidos nucleicos foram determinados às 48h (A), 72h (B), 96h (C) 7 dias (D). Os resultados são expressos por médias de três experiências independentes e triplicados de cada amostra e desvio padrão.

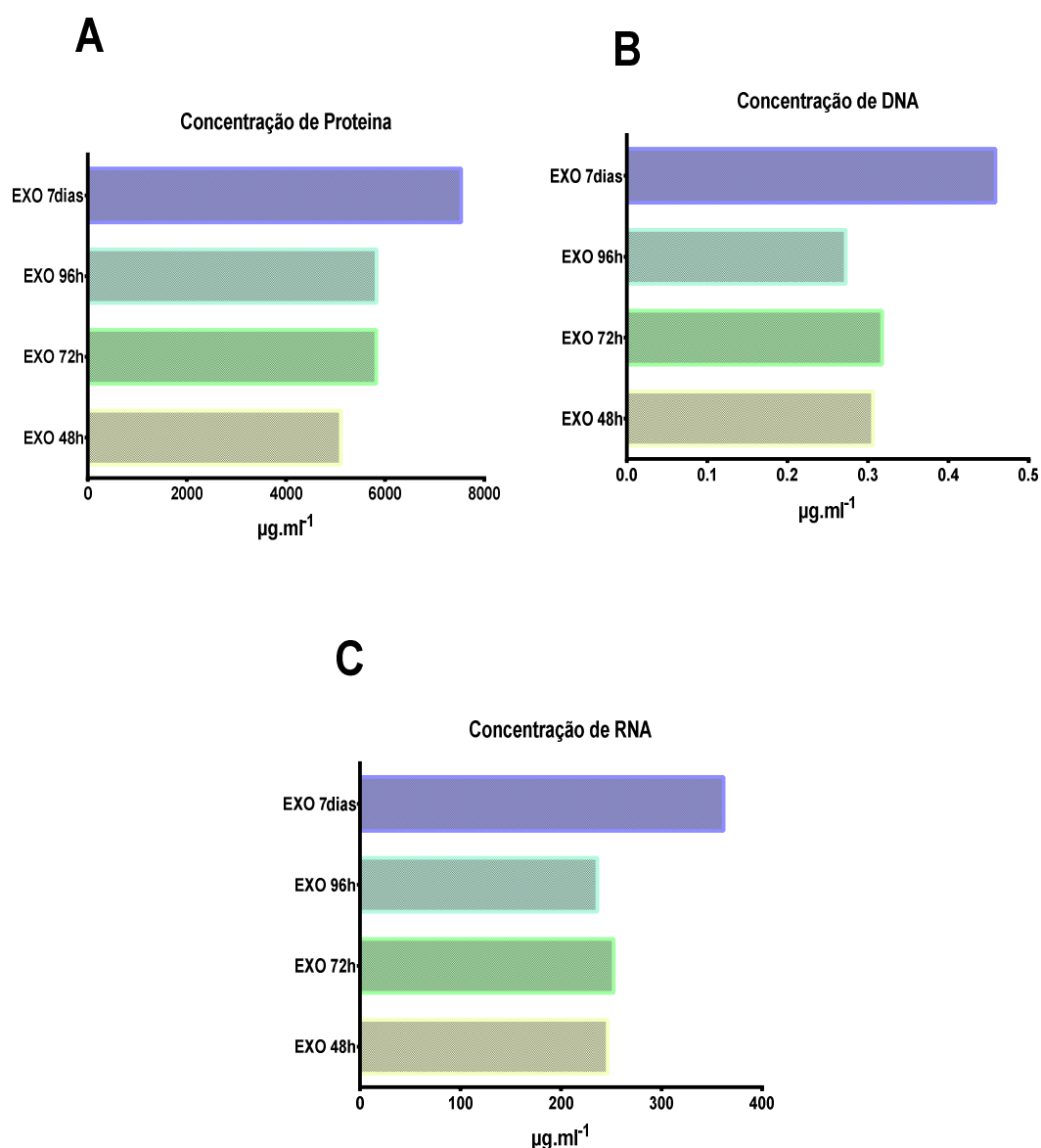


Figura 12 - Evolução dos níveis de proteína (A), DNA (B) e RNA (C) em exossomas de *T. b. brucei* ao longo do tempo. A concentração de proteína (A), de DNA (B) e RNA (C) foi quantificado em exossomas isolados de meios de cultura com 48h, 72h, 96h e 7 dias de incubação. Os resultados encontram-se representados pela média de três experiências independentes e triplicados por amostra.

4.3. Macrófagos expostos a *T. b. brucei* e a exossomas parasitários produzem óxido nítrico e ureia

Foi quantificada a produção de NO e de ureia produzida por macrófagos expostos durante 6h, 8h, 12h, 18h e 24h a exossomas de *T. b. brucei* isolados a partir de meio de cultura com 48h, 72h, 96h e 7 dias de incubação com o parasita. Os macrófagos

foram também expostos a parasitas viáveis de *T. b. brucei*. Como controlo negativo foram utilizados macrófagos em repouso (não estimulados) que apresentaram sempre valores residuais de produção de NO e ureia. Como controlo positivo foram utilizados macrófagos estimulados com PMA. Neste caso, os macrófagos produziram níveis significativamente elevados de ureia ($p = 0,0156$; Fig. 13) e NO ($p = 0,0313$; Fig. 14) em todos os períodos de tempo analisados quando comparado com o controlo negativo.

Estes resultados indicam que os macrófagos utilizados estavam viáveis e funcionais, garantido a qualidade dos resultados obtidos.

Os macrófagos expostos a exossomas de *T. b. brucei* apresentaram sempre produção de ureia significativamente elevada (Fig. 13B, C, D e E) quando comparado com o controlo negativo ($p_{6h \text{ e } 8h} = 0,0156$; $p_{12h, 18h, 24h} = 0,0313$). De um modo geral os níveis foram superiores ao controlo positivo (Fig. 13) e não se verificaram oscilações importantes ao longo do tempo de exposição (6h - 24h). Para além disso, os níveis de produção foram semelhantes independentemente da origem dos exossomas.

Estes resultados, indicam que os exossomas de *T. b. brucei* induzem os macrófagos de murganho a produzirem níveis similares de ureia, independentemente do tempo de exposição e da sua origem.

Macrófagos expostos a parasitas viáveis de *T. b. brucei* (Fig. 13A) produziram níveis de ureia bastante elevados e significativamente diferentes dos controlos negativos ($p = 0,0078$) e controlo positivos ($p = 0,0313$). Verificou-se um aumento significativo na produção de ureia entre as 6h e as 18h de exposição ($p = 0,0156$) e depois um decréscimo acentuado entre as 18h e 24h de exposição ($p = 0,0313$)

Estes resultados indicam que o parasita e os exossomas parasitários induzem os macrófagos a produzir ureia. Porém, o parasita parece ter um efeito mais acentuado e variável, levando à produção de maiores quantidades de ureia.

Os macrófagos expostos aos parasitas de *T. b. brucei* produziram níveis bastante elevados de NO durante as 24h de estudo. Estes valores foram significativamente superiores ao controlo negativo ($p = 0,0078$) e positivo ($p = 0,0313$; Fig. 14A). Às 18h de exposição verificou-se um pico de produção de NO, que reflete um aumento significativo ($p = 0,0313$) entre as 12h e as 18h de exposição seguindo de um decréscimo significativo ($p = 0,0156$) entre as 18h e as 24h de exposição.

Os exossomas de *T. b. brucei* resultantes de diferentes tempos de incubação com o parasita também estimularam os macrófagos a produzirem NO. Os níveis de NO foram significativamente superiores ao controlo negativo ($p = 0,0078$) e ao controlo positivo ($p = 0,0313$) mas inferiores aos níveis atingidos com os parasitas viáveis (Fig. 14B, C, D e E). Exossomas de *T. b. brucei* com 48h e 72h de incubação (Fig. 14B e C) revelaram um padrão de produção de NO constante durante as 24h de observação. Curiosamente, os exossomas de *T. b. brucei* com 96h e 7 dias de crescimento (Fig. 14D e E) também revelaram um pico de produção de NO às 18h de exposição que reflete um aumento significativo ($p = 0,0313$) entre as 12h e as 18h de exposição seguindo de um decréscimo significativo ($p = 0,0156$) entre as 18h e as 24h de exposição. Estes resultados indicam que o parasita e os exossomas parasitários induzem os macrófagos a produzir NO. Porém, o parasita parece ter um efeito mais acentuado, levando à produção de maiores quantidades de NO.

Os macrófagos expostos aos parasitas e aos exossomas produziram simultaneamente ureia e NO (Fig. 13 e 14), mas quando comparamos os níveis de produção de *Novo* (normalizado ao valor do CN, ou seja, os valores foram divididos pela produção dos respetivos produtos dos macrófagos em repouso) da ureia e do NO, os níveis de produção de NO são muito superiores aos níveis de produção de ureia para os mesmos tempos de exposição, considerando os diferentes estímulos (Fig. 15). Os níveis de NO aumentaram cerca de 100× em macrófagos estimulados por parasitas viáveis (Fig. 15A) e à volta de 70× quando estimulados por exossomas (Fig. 15B, C, D e E). A produção de *Novo* da ureia por macrófagos estimulados pelo parasita ou pelos exossomas revelou um aumento de cerca de 6× ao longo das 24h de exposição (Fig. 15). A acumulação de ureia ao longo do tempo de exposição foi observada nos macrófagos expostos quer ao parasita (Fig. 16A) quer aos exossomas. Os níveis de acumulação foram similares nos macrófagos expostos aos exossomas (Fig. 16B, C, D e E) e ligeiramente superior nos macrófagos expostos ao parasita.

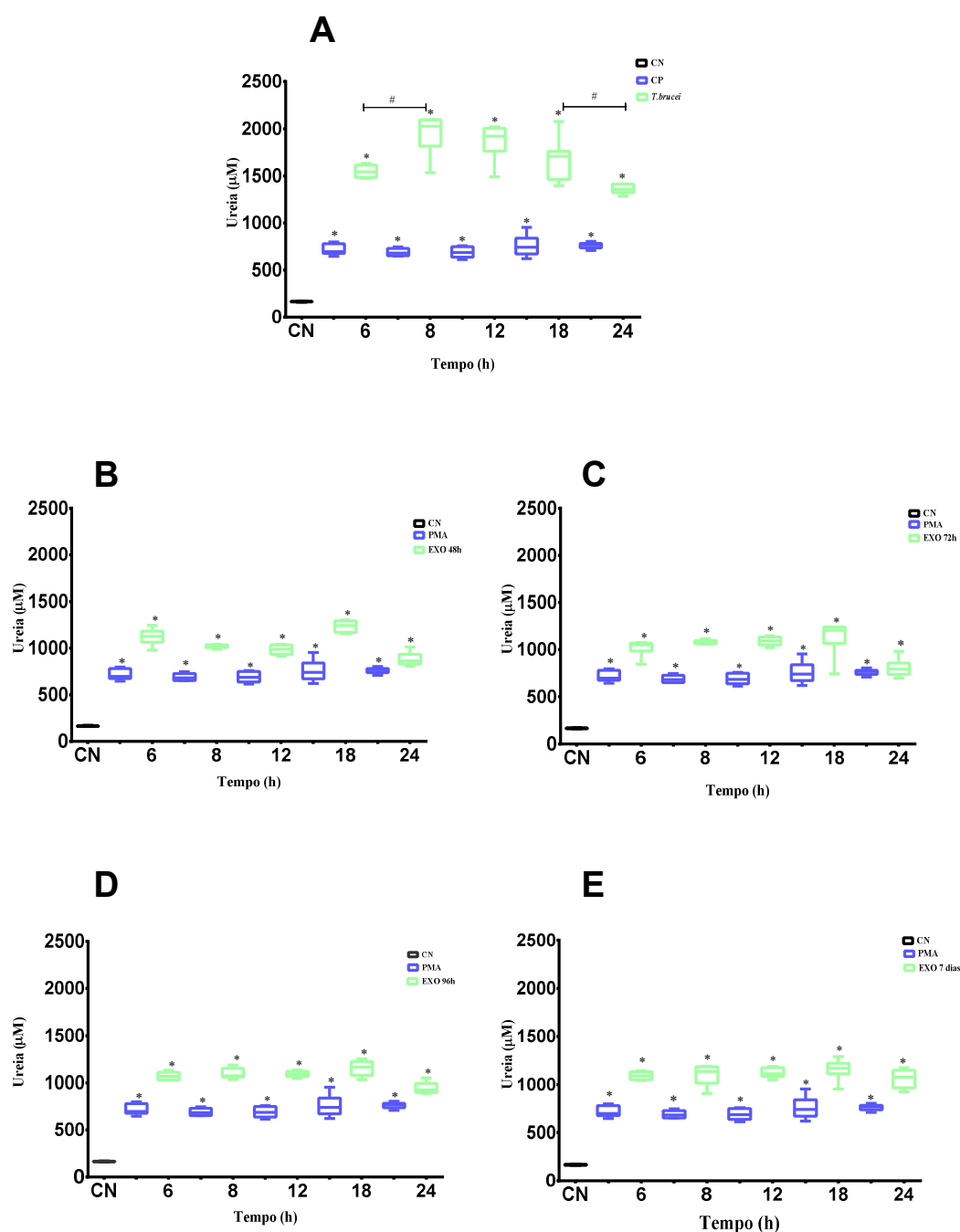


Figura 13 - Produção de ureia por macrófagos expostas a *T. b. brucei* e a exossomas parasitários. Os macrófagos foram expostos durante 6h, 8h, 12h, 18h e 24h a parasitas viáveis (A) e a exossomas isolados de meio de cultura com 48h (B), 72h (C), 96h (D) e 7 dias (E) de incubação com o parasite e a produção de ureia foi quantificada. Foi utilizado como controlo negativo (CN) macrófagos não estimulados (em repouso) e como controlo positivo macrófagos estimulados com PMA. Os resultados de três experiências independentes e de triplicados por amostra encontram-se representados por caixas de bigodes, valores medianos, mínimos e máximos. Os resultados foram estatisticamente analisados pelo teste não paramétrico de Wilcoxon ($p < 0,05$) para amostras emparelhadas. O símbolo (*) indica diferenças significativas entre o controlo negativo (CN) e os tempos analisados. O símbolo (#) indica diferenças significativas entre as 6h e as 8h de exposição e entre as 18h e as 24 h de exposição.

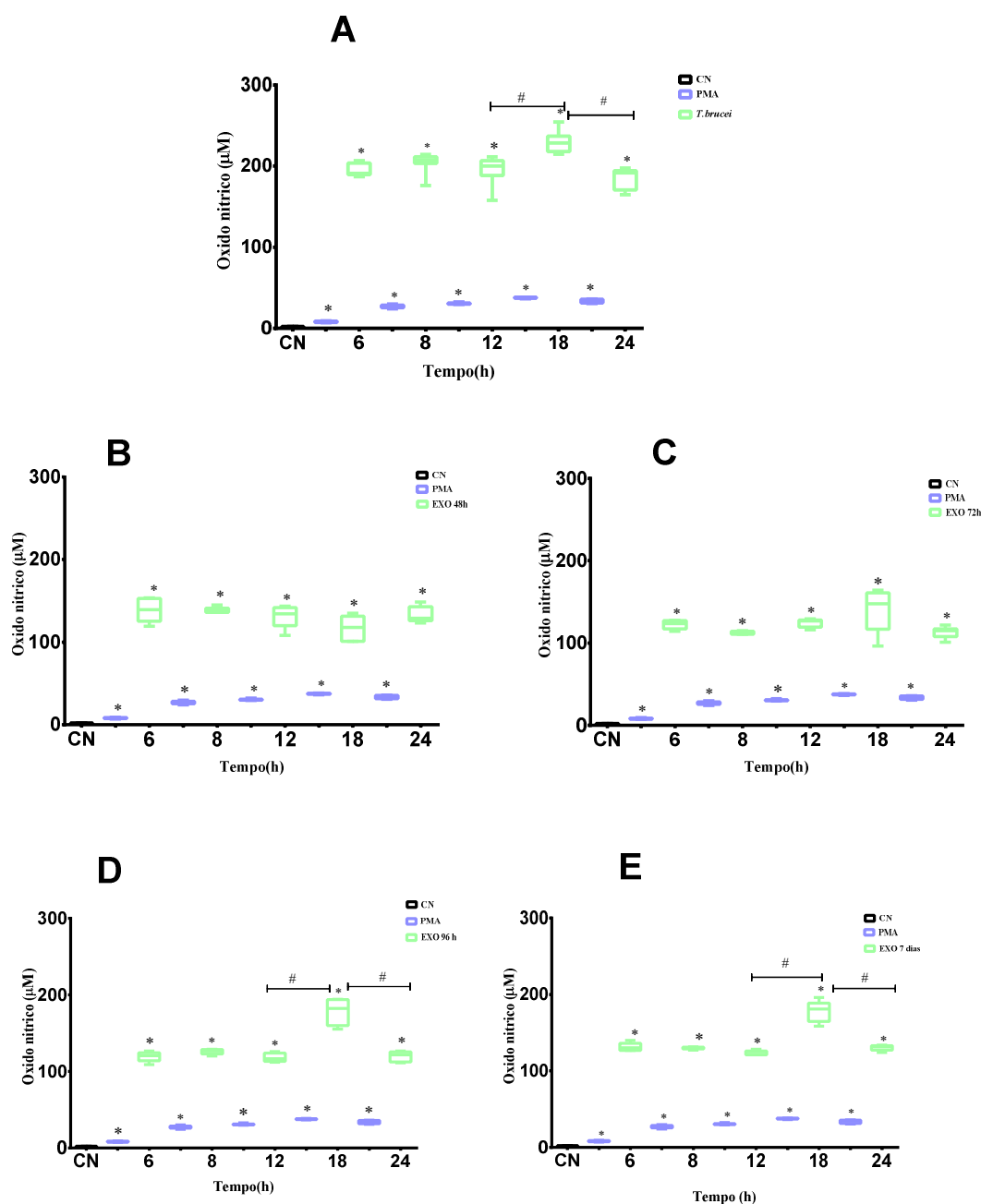


Figura 14 - Produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos expostas a *T. b. brucei* e a exossomas parasitários. Os macrófagos foram expostos por 6h, 8h, 12h, 18h e 24h a parasitas viáveis (A) e a exossomas isolados de meio de cultura com 48h (B), 72h (C), 96h (D) e 7 dias (E) de incubação com o parasite e a produção de NO foi quantificada. Foi utilizado como controlo negativo (CN) macrófagos não estimulados (em repouso) e como controlo positivo macrófagos estimulados com PMA. Os resultados de três experiências independentes e de triplicados por amostra encontram-se representados por caixas de bigodes, valores medianos, mínimos e máximos. Os resultados foram estatisticamente analisados pelo teste não paramétrico de Wilcoxon ($p < 0,05$) para amostras emparelhadas. O símbolo (*) indica diferenças significativas entre o controlo negativo (CN) e os tempos analisados. O símbolo (#) indica diferenças significativas entre as 12h e as 18h de exposição e entre as 18h e as 24 h de exposição.

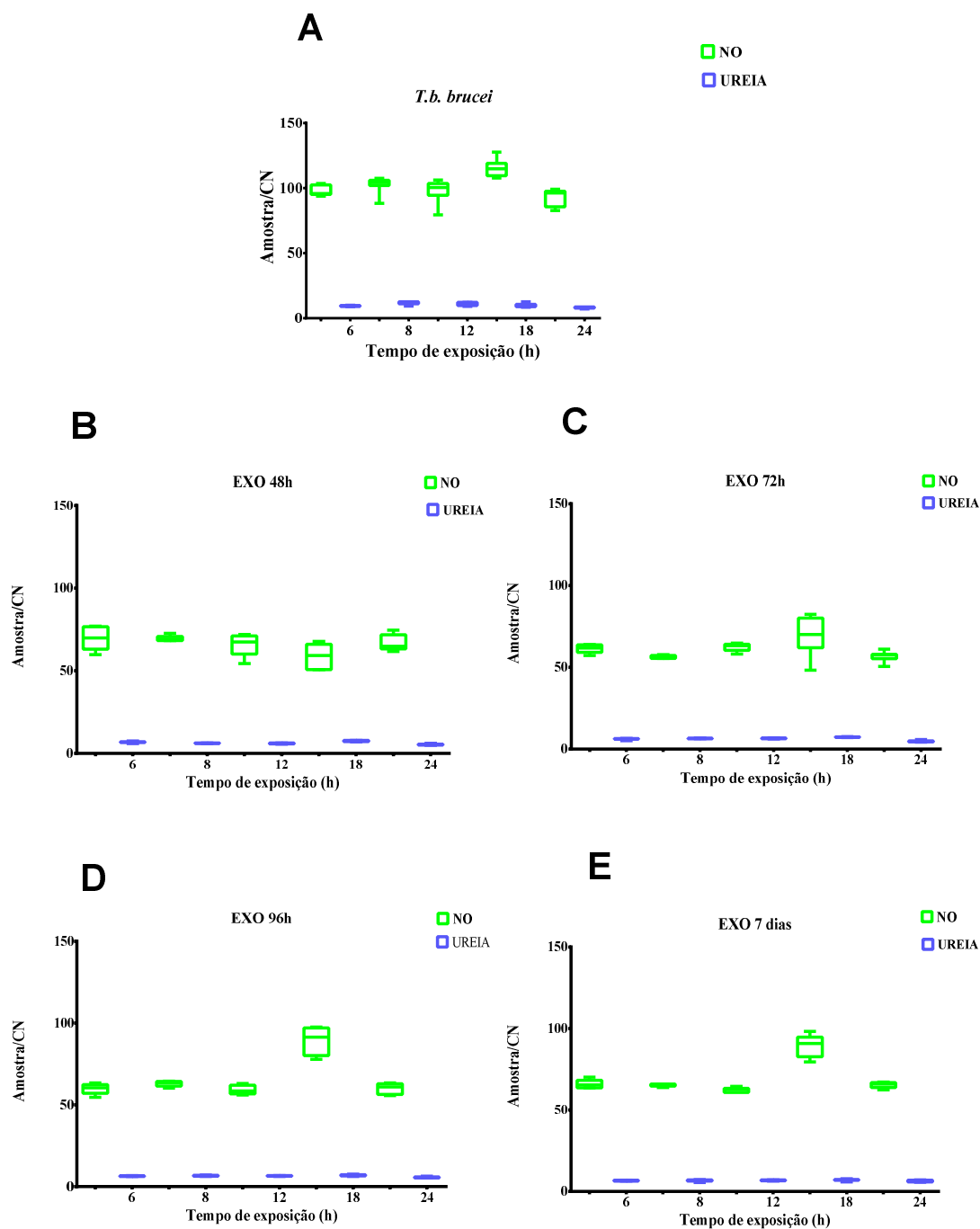


Figura 15 - Produção de *Novo* de NO e ureia por macrófagos expostas a *T. b. brucei* e a exossomas parasitários. Os níveis de NO e ureia induzidos por parasitas viáveis (A) e por exossomas de 48h (B), 72h (C), 96h (D) e 7 dias (E) quantificado ao longo do tempo de exposição (6h, 8h, 12h, 18h e 24h) foram normalizados pelos níveis residuais apresentados por macrófagos em repouso. Os resultados de três experiências independentes e de triplicados por amostra encontram-se representados por caixas de bigodes, valores da mediana, mínimos e máximos.

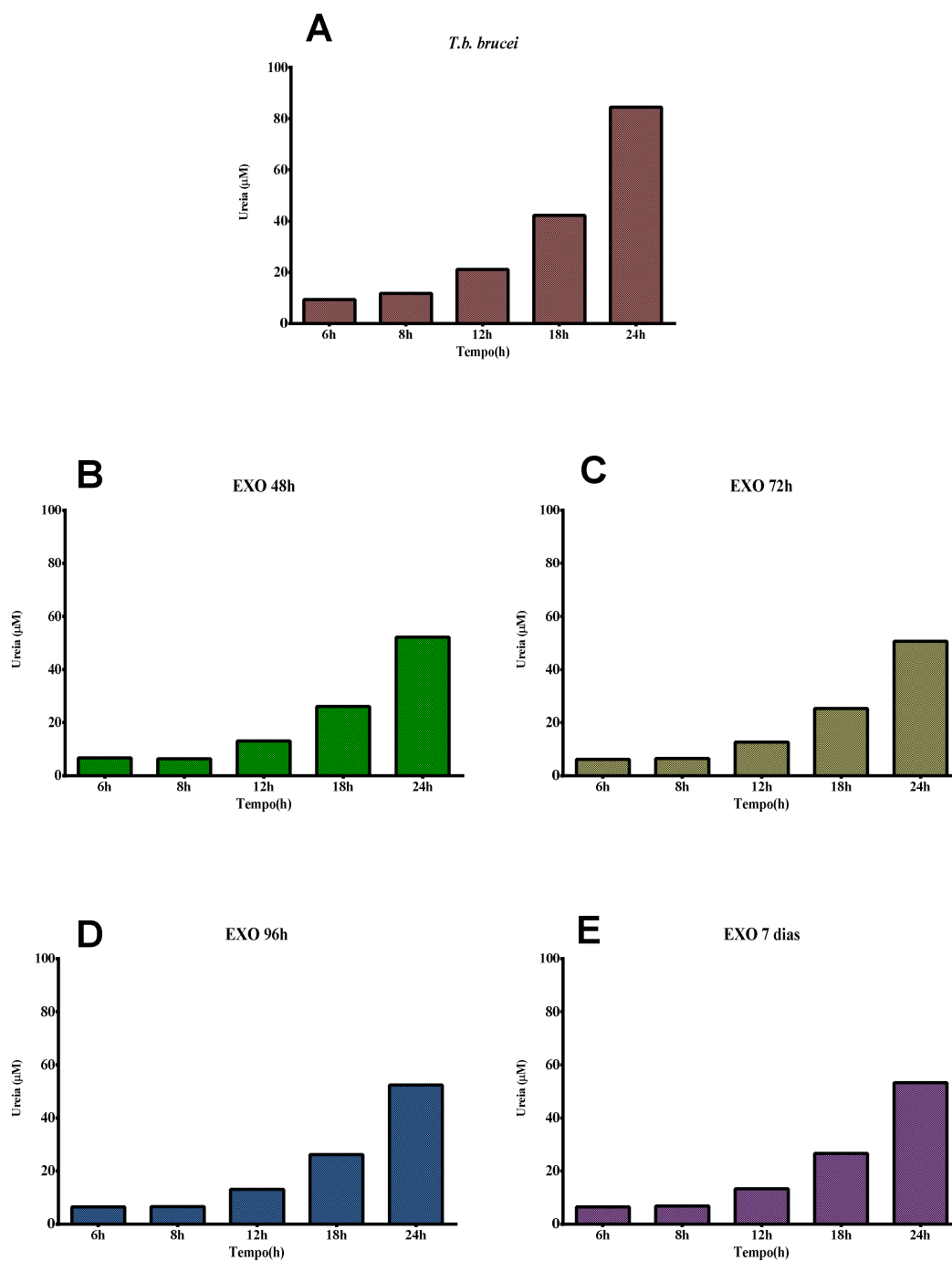


Figura 16 - Acumulação de ureia por macrófagos expostas a *T. b. brucei* e a exossomas. A acumulação de ureia foi estimada em macrófagos expostos a parasitas viáveis (A), a exossomas de 48h (B), exossomas de 72h (C), exossomas de 96 h (D) e a exossomas de 7 dias (E), ao longo de 24h.

4.4. Exossomas de *T. b. brucei* promovem a expansão das subpopulações de macrófagos MHCII⁺, MHCII⁺ e MHCII⁺MHCII⁺

Para analisar a capacidade de *T. b. brucei* e dos exossomas de induzirem a expressão de MHCII e MHCII em macrófagos foram utilizados parasitas viáveis e exossomas isolados de meio de cultura com 48h e 7 dias de incubação com o parasita. Como controlo negativo foram utilizados macrófagos em repouso (CN) e macrófagos estimulados com PMA (CP).

A frequência de macrófagos não estimulados (CN) com fenótipo MHCII⁺, MHCII⁺ e duplo positivo (MHCII⁺MHCII⁺) mostrou-se reduzida, porém a estimulação com PMA causou aumento significativo de macrófagos MHCII⁺ ($p = 0,0078$; Fig. 18A), MHCII⁺ ($p = 0,0078$; Fig. 18B) e duplos positivos ($p = 0,0078$; Fig. 18C), indicando que os macrófagos utilizados para esta análise encontravam-se viáveis e funcionais.

Apesar de se ter verificado um aumento significativo na expressão de MHCs pelos macrófagos, a percentagem destas células não atingiu os 10%. Para todos os casos analisados a percentagem de macrófagos duplos positivos (MHCII⁺ MHCII⁺) foi muito baixa, sendo que a maioria dos macrófagos apresentam um fenótipo duplo negativo (MHCII⁻MHCII⁻) (Fig. 17).

O contacto com o parasita não causou alterações significativas na frequência dos macrófagos MHCII⁺ e macrófagos MHCII⁺, mas originou redução significativa na frequência de macrófagos duplos positivos quando comparados com o controlo negativo ($p = 0,0195$).

A exposição aos exossomas induziu aumento significativo da frequência de macrófagos MHCII⁺ ($p = 0,0313$), macrófagos MHCII⁺ ($p = 0,0313$) e macrófagos duplos positivos ($p = 0,0313$) quando comparados com o controlo negativo. Os exossomas com 7 dias de crescimento causaram aumento significativo de macrófagos MHCII⁺ ($p = 0,0273$) quando comparados com os exossomas de 48h. Os exossomas de 48h causaram expansão significativa da subpopulação de macrófagos MHCII⁺ quando comparados com os exossomas de 7 dias.

Estes resultados sugerem que os exossomas de 48h induzem a apresentação antigénica aos linfócitos T CD8⁺ e que os exossomas de 7 dias privilegiam a apresentação antigénica aos linfócitos T CD4⁺.

A análise da intensidade de fluorescência que reflete a densidade de moléculas do MHC na superfície celular dos macrófagos, permitiu verificar que nos macrófagos estimulados com PMA a expressão de MHCI (Fig. 19A) e MHCII (Fig. 19B) aumentou significativamente quando comparado com macrófagos em repouso ($p = 0,0156$). Porém, os macrófagos expostos aos parasitas ou aos exossomas não mostraram aumento da densidade membranar de MHCI (Fig. 19A) e de MHCII (Fig. 19B). Pelo contrário, os parasitas ($p = 0,0313$) e os exossomas de 7 dias ($p = 0,0313$) causaram diminuição significativa da densidade do MCHI e os exossomas de 48h não apresentaram efeito considerável.

Estes resultados sugerem que tanto o parasita com os exossomas de 7 dias afetam negativamente a densidade de MCHI na superfície celular dos macrófagos, mas que os exossomas de 48h não induzem alterações na densidade de MHCI e MHCII.

A análise da correlação da frequência de macrófagos MHCI⁺ ou MHCII⁺ expostos a parasitas viáveis ou a exossomas respectivamente com a densidade molecular de MHCI ou MHCII (Fig. 20) mostrou que ao longo das 72h de exposição se verificou a expansão da população de macrófagos MHCII⁺ em simultâneo com o aumento da densidade das moléculas MCHII induzido por exossomas de 48h ($p = 0,0302$, Fig.20D). Porém, os exossomas de 48h promoveram a expansão da população de macrófagos MHCI⁺ ao mesmo tempo que promoveram a redução da densidade das moléculas MHCI ($p = 0.0072$, Fig.20A).

Estes resultados sugerem que os exossomas iniciais (48h) promovem a diferenciação de APCs e a apresentação antigénica aos linfócitos Th ao mesmo tempo que controlam negativamente a apresentação antigénica aos linfócitos citotóxicos, através da diminuição das moléculas MHCI. Por outro lado, o parasita parece não perturbar excessivamente quer a diferenciação macrofágica quer a densidade molecular.

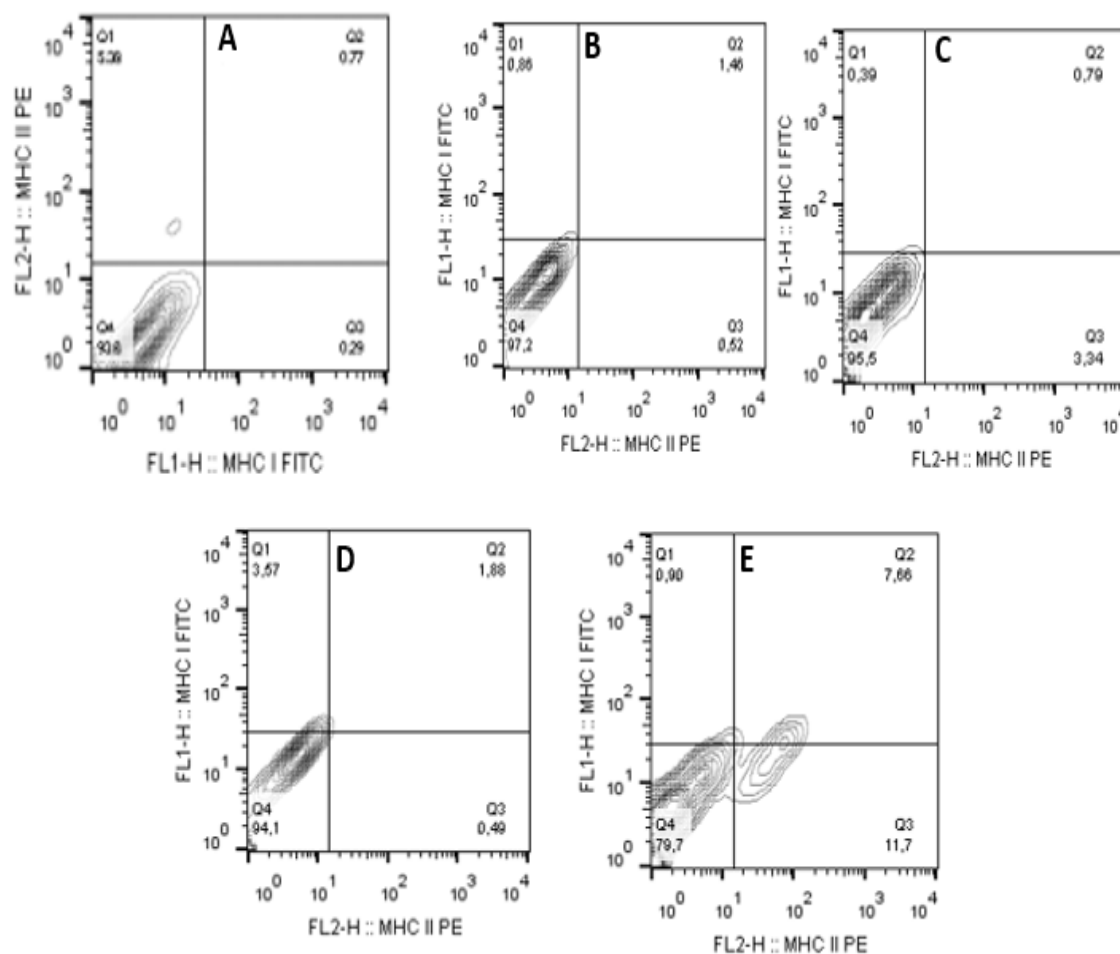


Figura 17 - Dot-plots representativos de macrófagos estimulados por *T. b. brucei* e exossomas parasitários. Os macrófagos expostos a parasitas viáveis (A), a exossomas de 48h (D), exossomas de 7 dias (E) foram incubados durante 72h e marcados com monoclonais anti-MHCI e MHCII. Foi utilizado como controle negativo macrófagos não estimulados (B) e como controle positivo macrófagos estimulados com PMA (D).

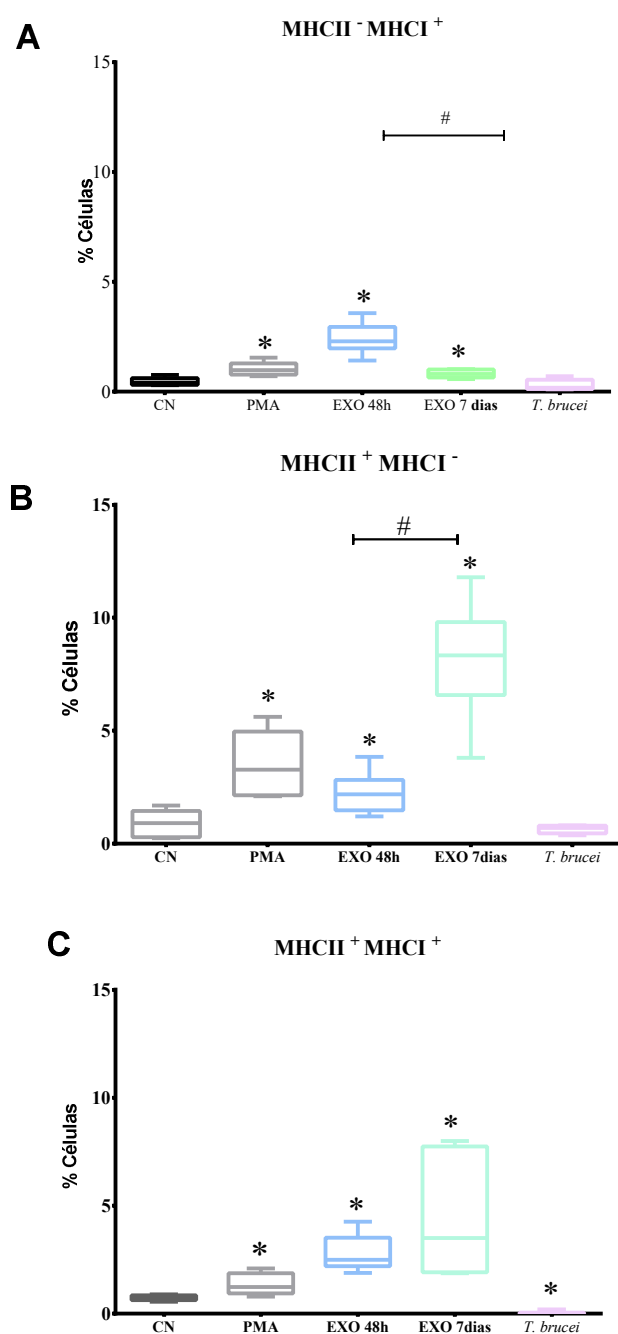


Figura 18 - Frequência de macrófagos MHC I⁺, macrófagos MHC II⁺ e macrófagos duplos positivos (MHC I⁺ MHC II⁺) induzido por *T. b. brucei* e exossomas parasitários. Os macrófagos expostos a parasitas viáveis, a exossomas de 48h (EXO 48h) e exossomas de 7 dias (EXO 7 dias) foram incubados durante 72h e foram marcados e analisados por citometria de fluxo, tendo-se registado a frequência de células MHC I⁺ (A), MHC II⁺ (B) e duplas positivas (C). Foi utilizado como controlo negativo (CN) macrófagos não estimulados (em repouso) e como controlo positivo macrófagos estimulados com PMA (PMA). Os resultados de três experiências independentes e de triplicados por amostra encontram-se representados por caixas de bigodes, medianas, mínimos e máximos. Os resultados foram estatisticamente analisados pelo teste não paramétrico de Wilcoxon ($p < 0,05$) para amostras emparelhadas. O símbolo (*) indica diferenças significativas entre o CN e as outras condições e o símbolo (#) indica diferenças significativas entre os exossomas de 48 h e de 7 dias.

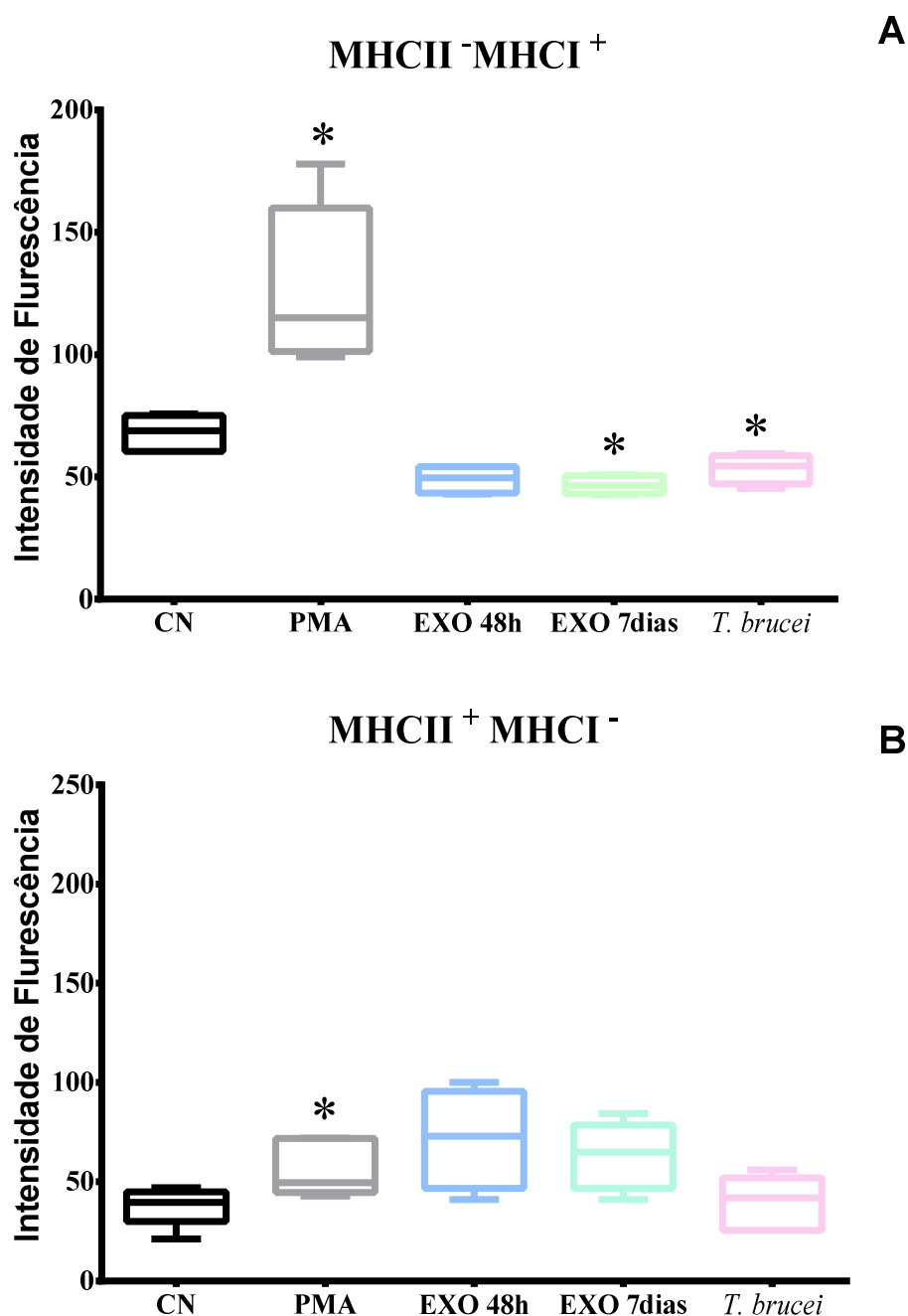


Figura 19 - Níveis de densidade membranar de MCHI e MHCII em macrófagos expostos a *T. b. brucei* e exossomas de 48h e de 7 dias. Os macrófagos expostos a parasitas viáveis e a exossomas isolados de meio de cultura com 48h (EXO 48H) e 7 dias (EXO 7 dias) de incubação com o parasite foram marcados para MHCII e MHCII e analisados por citometria de fluxo. Foi utilizado como controlo negativo (CN) macrófagos não estimulados (em repouso) e como controlo positivo macrófagos estimulados com PMA (PMA). Os resultados de três experiências independentes e de triplicados por amostra encontram-se representados por caixas de bigodes, valores medianos, mínimos e máximos. Os resultados foram estatisticamente analisados pelo teste não paramétrico de Wilcoxon ($p < 0,05$) para amostras emparelhadas. O símbolo (*) indica diferenças significativas quando se compara o controlo negativo (CN) e com as outras condições.

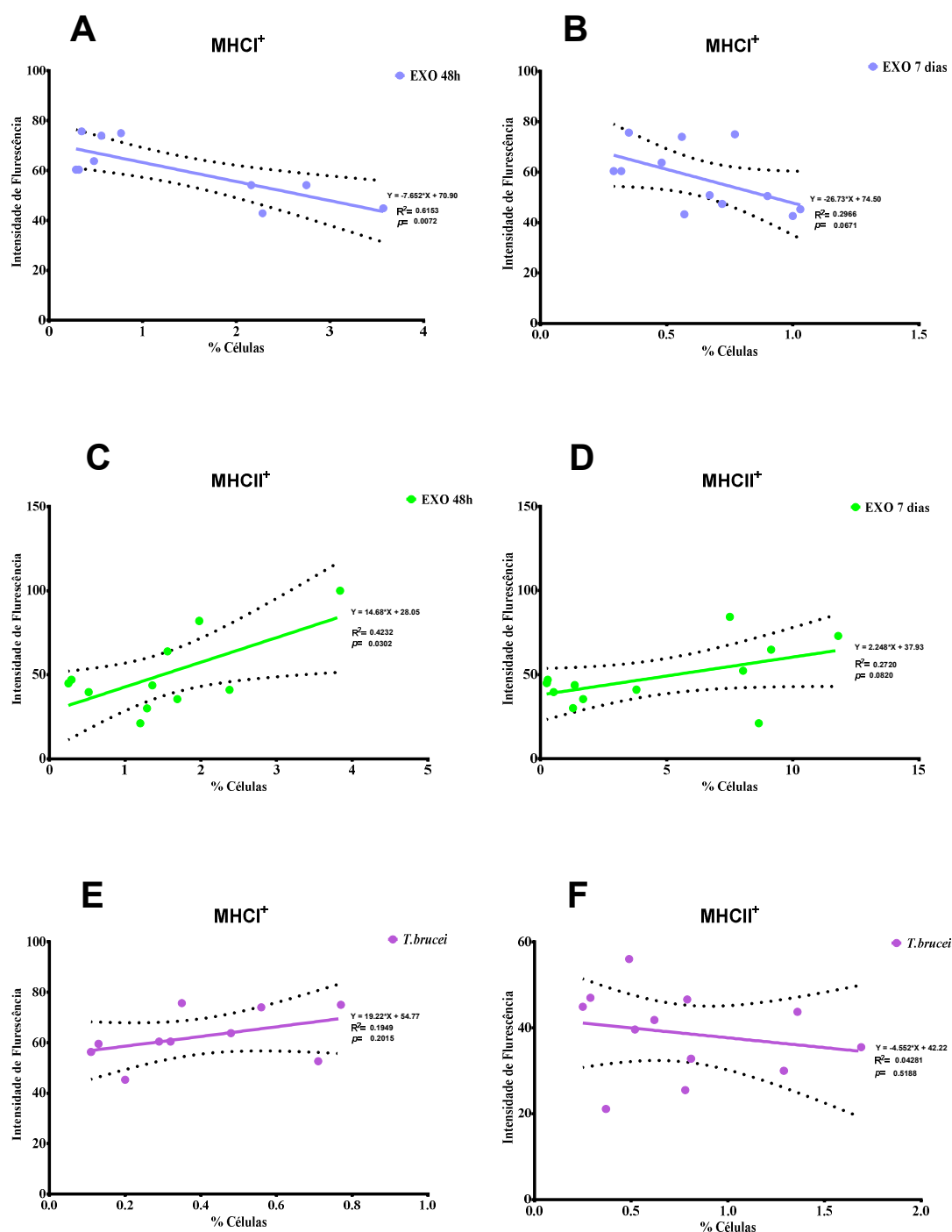


Figura 20 - Correlação entre a frequência de macrófagos MHCII⁺ e MHCII⁺ e a densidade das moléculas MHCII e MHCII ao longo do tempo de exposição a parasitas viáveis e a exossomos. Foi gerada uma regressão linear entre a frequência de macrófagos com fenótipo MHCII⁺ (A, C e E) e MHCII⁺ (B, D, F) e a densidade das moléculas MHCII e MHCII na membrana celular, ao longo de 72h de exposição aos exossomos de 48h (A e C) e de 7 dias (B e D) e a parasitas viáveis de *T. b. brucei* (E e F). Os resultados foram estatisticamente analisados pelo teste não paramétrico de Wilcoxon ($p < 0,05$) para amostras emparelhadas.

5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Os tripanossomas africanos são parasitas que têm sido intensamente estudados por causarem doença em seres humanos e em animais, nomeadamente no gado, o que constitui um problema de grande importância a nível de saúde pública e, simultaneamente dificulta o desenvolvimento socioeconómico das populações afetadas.

Os estudos já realizados mostraram que são vários os mecanismos que *T. brucei* utiliza para se evadir e modular o sistema imunitário do hospedeiro de modo a conseguir sobreviver e estabelecer infeção. No entanto, existem ainda algumas questões que permanecem sem resposta e alguns mecanismos que não são inteiramente compreendidos.

A capacidade do parasita em regular a resposta imunitária inata do hospedeiro é crucial para a progressão da infeção e desenvolvimento da tripanossomose (Harris et al., 2007). Em murganhos foi demonstrado que a infeção por *T. b. brucei* causava grande expansão da população de macrófagos no fígado, baço e medula óssea (Gobert et al., 2000).

À semelhança das células eucariotas e de outros organismos eucariotas, também foi demonstrado que *T. b. brucei* segrega exossomas. Os exossomas de *T. b. brucei* incorporam várias proteínas flagelares que funcionam como fatores de virulência, e que protegem o parasita dos efeitos nocivos da resposta imunitária do hospedeiro humano (Geiger et al., 2010; Szempruch et al., 2016). Outros estudos sugerem que os exossomas afetam a mobilidade social de *T. b. brucei* (Oberholze et al., 2010; Imhof et al., 2014) e que podem ser usados pelo parasita para confundir a resposta imunitária inata do hospedeiro, facilitando a sobrevivência dos parasitas (Szempruch et al., 2016; Dror et al., 2017).

Este trabalho experimental teve como objetivo clarificar o efeito dos exossomas na resposta imunitária do hospedeiro, avaliando o efeito dos exossomas de tripomastigotas de *T. b. brucei* na atividade dos macrófagos.

Neste estudo foram utilizados meios de cultura livres de nanovesículas e um kit comercial para o isolamento de nanovesículas a partir dos meios de cultura de

tripomastigotas, substituindo métodos de purificação mais demorados como a ultra centrifugação. Através de metodologias diferentes, como a microscopia eletrónica e ensaios de nanotecnologia foi possível demonstrar o isolamento de estruturas vesiculares compatíveis com a corrente definição de exossomas. Assim, a metodologia utilizada mostrou-se eficiente no isolamento de exossomas de *T. b. brucei*.

A análise preliminar da composição dos exossomas permitiu inferir que são maioritariamente constituídos por proteínas e RNA. A quantidade de DNA presente nos exossomas parece ser residual.

Encontra-se descrito que os exossomas resultam da fusão de compartimentos endocíticos intermediários ou corpos multivesiculares com a membrana celular (James et al., 2016), pelo que a elevada quantidade de proteína encontrada é muito provavelmente decorrente da composição membranar mas também de outras proteínas. De facto, um estudo anterior (Dror et al., 2017) identificou várias proteínas flagelares incorporadas nos exossomas de *T. b. brucei*. Está também descrito em vários estudos (Thakur et al., 2014, Zhou et al., 2018) efetuados com exossomas de diferentes tipos celulares, que a sua constituição predominante são as proteínas e o RNA, no entanto em alguns casos foi também detetado a presença de DNA. Estes dois ácidos nucleicos presentes nos exossomas têm sido alvo de vários estudos, nomeadamente no que respeita à investigação como biomarcadores capazes de identificar e direcionar o tratamento, como por exemplo no caso do cancro (Thakur et al., 2014; Zhou et al., 2018).

Os exossomas segregados por *T. b. brucei* para o meio de cultura parecem manter uma composição estável, em termos de concentração proteica e de ácidos nucleicos ao longo de 96h, uma vez que apenas se detetaram ligeiras flutuações nas concentrações destas macromoléculas. Porém, os exossomas obtidos ao fim de 7 dias evidenciaram alterações importantes na sua composição, que incluiu o aumento considerável da concentração proteica e dos ácidos nucleicos, especialmente RNA. Este resultado aponta para a ocorrência de alterações periódicas na composição dos exossomas segregados pelo parasita. No modelo roedor está descrito (Matthews et al., 2005) que o primeiro pico da parasitemia de *T. b. brucei* ocorre ao 7º dia de infeção, seguido de diminuição considerável da parasitemia e alteração da composição proteica membranar do parasita devido á mudança da VSG. A diminuição da parasitemia deve-se à resposta imunitária do hospedeiro que induz a necessidade de alteração para uma membrana

diferente como estratégia de sobrevivência do parasita. Sabendo que, o meio de cultura axénico (meio líquido quimicamente definido e maioritariamente constituído por aminoácidos e sais) utilizado para manter o parasita *in vitro* não possui mediadores imunitários, tanto mais que o soro utilizado (soro fetal bovino livre de exossomas) sofreu um processo de inativação dos fatores do complemento e de antigénios que pudessem existir antes de ser adicionado ao meio de cultura, considera-se que neste caso a alteração da constituição dos exossomas libertados pelo parasita não depende da resposta imunitária do hospedeiro. Surge então a questão, poderão os tripomastigotas estarem predispostos a produzir alterações das macromoléculas (sem que se verifique um estímulo por parte do hospedeiro) que se refletem na constituição dos exossomas libertados? Ou as alterações decorrem das modificações do próprio meio? Estas questões merecem ser consideradas recorrendo a estudos mais diferenciados que permitam a identificação das proteínas e a sequência dos ácidos nucleicos presentes nos exossomas obtidos ao longo do tempo em cultura.

No presente trabalho foi analisado o efeito dos exossomas na imunidade inata do hospedeiro através do uso de uma linha celular de macrófagos de roedor, minimizando a necessidade de utilização de murganhos. Tal como o próprio parasita, os exossomas induziram os macrófagos a produzir simultaneamente ureia e NO promovendo a diferenciação de macrófagos com fenótipo pró (M1) e anti-inflamatório (M2). A ativação simultânea de macrófagos do tipo M1/M2 evita a polarização da resposta imunitária, promovendo um estado de equilíbrio ativo que favorece a infeção sem causar a morte do hospedeiro, permitindo a continuidade do ciclo de vida do parasita. A diferenciação de macrófagos M2 pode ser desencadeada para o benefício do próprio parasita, já que os produtos da sua degradação metabólica induzem o crescimento do parasita (Lott et al., 2014) e permitem a reparação tecidular e diminuição da resposta inflamatório do hospedeiro. De facto, a cadeia pesada de cinesina-1 (TbKHC-1) libertada por tripanossomas africanos induz a ativação da via de arginina, levando à produção de poliaminas. As poliaminas são nutrientes essenciais para a sobrevivência do tripanossoma (De Muylder et al., 2013). Tendo em conta os resultados obtidos e os conhecimentos existentes pode-se colocar a hipótese de os exossomas transportarem TbKHC-1.

Os níveis de ureia e NO produzidos pelos macrófagos expostos aos exossomas são superiores ao controlo positivo, mas não apresentam diferenças significativas ao

longo das 24h de incubação nem variam com o tipo de exossoma utilizado, revelando estabilidade na ativação macrofágica. O parasita também ativa as duas vias da arginina do macrófago, a da arginase e a da iNOS, mas neste caso os níveis da ureia e NO produzidos são muito maiores mas sem grandes flutuações ao longo do tempo de incubação. A persistência de uma resposta tipo M1 está associada à síndrome de resposta inflamatória sistêmica (SIRS) na doença do sono (Bertero et al., 1997; Davies et al., 1997; Stijemans et al., 2007). Em murganhos infetados com *T. b. brucei* os níveis de NO_2^- atingem um máximo ao 6º dia de infecção (Gobert et al., 2000). O aumento progressivo dos níveis de NO pode constituir uma desvantagem para o hospedeiro devido ao grande espectro de distúrbios do metabolismo celular causados pela ação do NO. Para contrabalançar o efeito nocivo de produção de NO para o hospedeiro, uma vez que para perpetuar o ciclo de vida o parasita necessita de diminuir o seu efeito na mortalidade do hospedeiro, os tripanossomas africanos induzem a diferenciação de macrófagos anti-inflamatórios.

Os exossomas de *T. b. brucei* parecem ter um papel importante no estágio inicial da infecção, (i) reforçando a modulação dos macrófagos para fenótipos M1/M2, (ii) garantindo o equilíbrio entre respostas inflamatórias e anti-inflamatórias e (iii) assegurando a disponibilidade de poliaminas essenciais à proliferação do parasita.

Os exossomas induzem a diferenciação de macrófagos MHC I^+ , macrófagos MHC II^+ e macrófagos duplos positivos ($\text{MHC I}^+\text{MHC II}^+$), indicando que estas células estão em condições para apresentar antígenos parasitários e estabelecer a ligação com a imunidade adquirida. Porém, os dois tipos de exossomas estudados (exossomas provenientes de culturas de *T. b. brucei* com 48h e 7 dias de incubação) evidenciaram diferenças significativas. Os exossomas libertados mais precocemente (48h) pelo parasita favorecem a diferenciação de macrófagos MHC I^+ , ou seja promovem a apresentação antigénica a linfócitos TCR^+ , favorecendo a resposta citotóxica. Pelo contrário, os exossomas mais tardios (7 dias) dirigem a diferenciação de APCs que conduzem à ativação de linfócitos T helper.

Contrariamente aos exossomas, o parasita aparentemente não tem qualquer efeito na diferenciação de macrófagos e até causou a diminuição significativa dos macrófagos duplos positivos, evitando a apresentação antigénica e a ativação da imunidade adquirida.

Um estudo realizado com murganhos BALB/c infectados com *T. b. brucei* revelou que as células TCD8⁺ medeiam a mortalidade destes animais (Liu et al., 2015). Pelo que, impedir a apresentação antigénica e a consequente ativação de linfócitos citotóxicos pode ser uma das estratégias deste parasita para prolongar a vida do hospedeiro infectado, assegurar a sua própria sobrevivência e garantir a perpetuação do seu ciclo de vida. Um estudo anterior demonstrou que a produção de IFN- γ por células TCD4⁺ é crítico para a resistência do hospedeiro aos tripanossomas africanos. É provável que o IFN- γ exerça um efeito protetor para o hospedeiro através da ativação macrofágica, resultando na produção do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e do óxido nítrico, que medeiam a lise do parasita (Gongguan et al., 2015).

Curiosamente, apesar dos exossomas induzirem a diferenciação de macrófagos MHCI⁺, macrófagos MHCII⁺ e macrófagos duplos positivos, a densidade de moléculas MHCII na superfície membranar dos macrófagos manteve-se semelhante aos macrófagos em repouso. Para além disso, tanto os parasitas como os exossomas mais tardios (7 dias) causaram acentuada redução na densidade das moléculas MHCI, dificultando a complexação dos antígenos parasitários com as moléculas MHC e consequentemente, afetando o reconhecimento da presença do parasita pelos linfócitos T e comprometendo a imunocompetência do hospedeiro na luta contra a infeção por *T. brucei*. Embora ainda não totalmente compreendido, um mecanismo idêntico de inibição da expressão de MHC foi referido num estudo efetuado em *T. cruzi*, parasita intracelular responsável pela doença de Chagas ou tripanossomose americana, evitando a degradação dos proteínas e a apresentação antigénica (Camargo et al., 2014).

Por outro lado, as células NK possuem recetores que se ligam às moléculas MHCI da membrana celular, permanecendo inativas em circulação. No entanto, quando os níveis de MHCI da superfície celular diminuem, as células NK ficam ativas e competentes para induzir uma resposta imunitária citotóxica. Assim, a diminuição da densidade de MHCI nos macrófagos pode implicar a ativação das células NK e a indução da apoptose dos macrófagos, reduzindo a competência da imunidade inata. A apoptose macrofágica conduz à redução da produção de radicais oxidativos, com é o caso do NO, e até de outros mecanismos microbicidas, como por exemplo a eventual formação de armadilhas extracelulares. Um estudo anterior realizado em murganhos infectados com *T.*

b. brucei demonstrou que a atividade das células NK é severamente reduzida (Vincendeau et al., 2006) após nove dias de infecção.

Os resultados obtidos no presente estudo indicam que os exossomas libertados por *T. b. brucei* desempenham um papel oposto ao do próprio parasita na diferenciação de macrófagos MHC^I⁺, macrófagos MHC^{II}⁺ e macrófagos duplos positivos, sugerindo a ativação da imunidade adquirida através da ativação de linfócitos T citotóxicos e T helper. Contudo apenas se verificou correlação positiva significativa, ainda que ligeira, entre a expansão dos macrófagos MHC^{II}⁺ e o aumento da densidade das moléculas MHC^{II}, reforçando a possível existência de alguma apresentação antigénica aos linfócitos Th. De facto, encontra-se descrito que as células TCD4⁺ quando ativadas segregam IFN- α que funciona como um fator de crescimento de *T. b. brucei* (Liu et al., 2015). Por outro lado, os exossomas amplificam a atividade do parasita na modulação negativa da expressão de MHC^I, comprometendo especificamente a competência citotóxica da imunidade adquirida e favorecendo a atividade citotóxica inespecífica. É possível que a modulação induzida pelos exossomas nos macrófagos facilite a permanência do parasita no hospedeiro.

Em resumo, este estudo analisou pela primeira vez o efeito dos exossomas de *T. b. brucei* na atividade macrofágica. Os exossomas segregados pelo parasita, embora possam apresentar diferente constituição parecem influenciar diretamente a resposta inata do hospedeiro de forma similar (Fig. 21). De facto, estas nanovesículas podem amplificar a modulação do sistema imunitário do hospedeiro induzido pelo parasita ou podem ter um papel oposto ao do parasita, participando na ativação da infecção e assegurando a sobrevivência do parasita, mas também interferindo na regulação da resposta adquirida do hospedeiro. Contudo, mais estudos experimentais são necessários para esclarecer o perfil bioquímico dos exossomas de *T. b. brucei* e o papel destas nanovesículas em outros aspetos da imunopatologia da infecção.

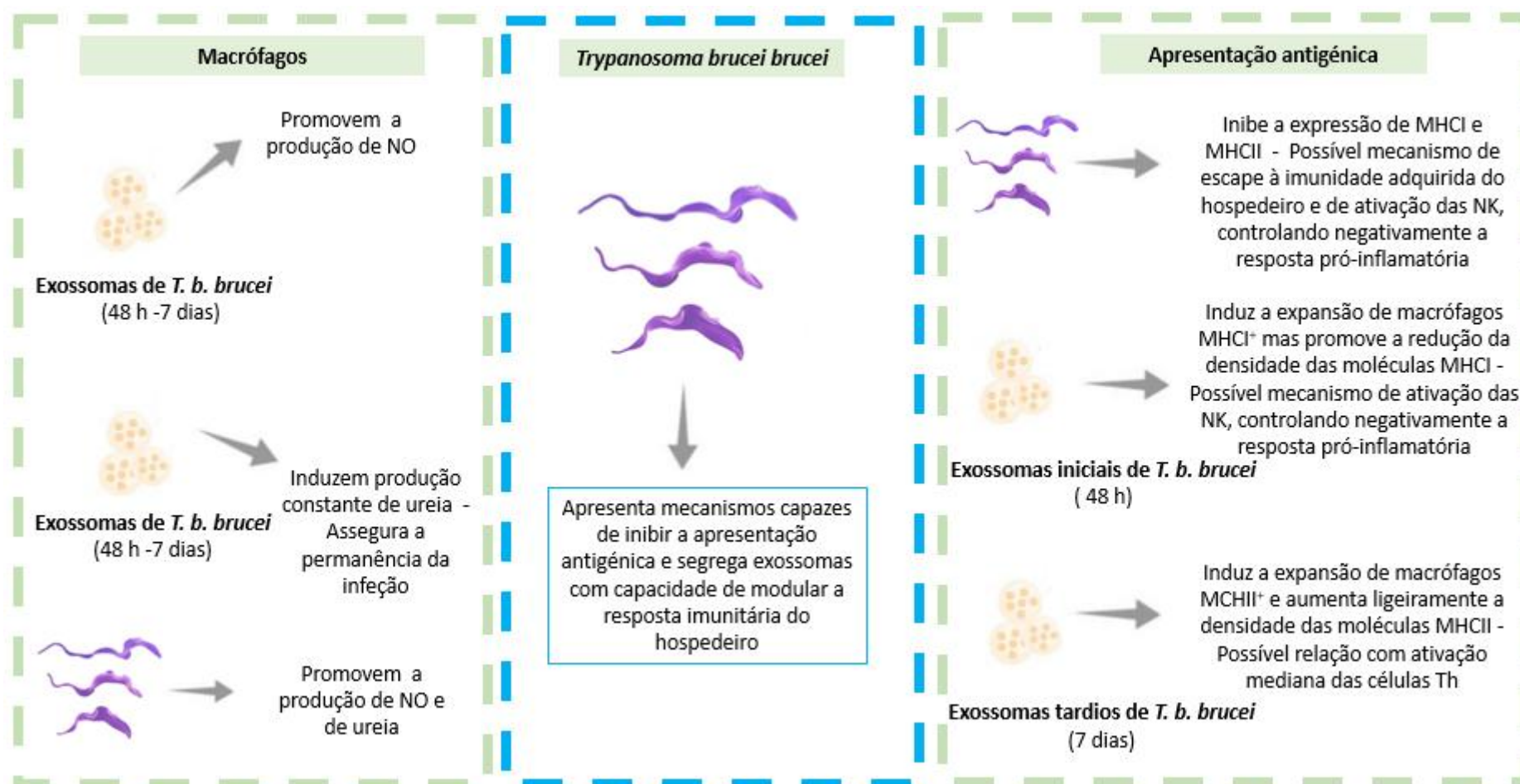


Figura 21 - Modelo representativo das interações que se estabelecem entre *T. b. brucei* e exossomas parasitários com os macrófagos do hospedeiro.

6. BIBLIOGRAFIA

BABOKHOV, P., SANYAOLU, O., OYIBO, A., FAGBENRO-BEYIOKU, F. & IRIEMENAM, C. 2013. A current analysis of chemotherapy strategies for the treatment of human African trypanosomiasis. *Pathogens Global Health*, 107(5), 242-252.

BANERJEE, H. & RACHUBINSKI, A. 2017. Involvement of SNARE protein Ykt6 in glycosome biogenesis in *Trypanosoma brucei*. *Molecular Biochemistry Parasitology*, 218, 28-37.

BARAL, T. 2010. Immunobiology of African Trypanosomes: Need of alternative interventions. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 24, 389-153.

BARRETT, M. P., BOYKIN, D. W., BRUN, R. & TIDWELL, R. 2007. Human African trypanosomiasis: pharmacological re-engagement with a neglected disease. *British Journal of Pharmacology*, 152, 1155-1171.

BARRETT, M. P., BURCHMORE, S., STICH, A., LAZZARI, J., FRASCH, A. C., CAZZULO, J. & KRISHNA, S. 2003. The trypanosomiasis. *Lancet*, 362, 1469-1480.

BERTERO, M. & CALIGARIS-CAPPIO, F. 1997. Anemia of chronic disorders in systemic autoimmune diseases. *Haematologica*, 82, 375-381.

BLACK, J., GUIRNALDA, P., FRENKEL, D., HAYNES, C. & BOCKSTAL, V. 2010. Induction and regulation of *Trypanosoma brucei* VSG-specific antibody responses. *Parasitology*, 137(14), 2041-2049.

BUUS, S., SETTE, A. & GREY, H. 1987. The interaction between protein-derived immunogenic peptides and Ia. *Immunological Reviews*, 98, 115-141.

CAMARGO, R., FARIA, L., KLOSS, A., FAVALI, F., KUCKELKORN, U., KLOETZEL, P., DE SA, M. & LIMA, D. 2014. *Trypanosoma cruzi* infection down-modulates the immunoproteasome biosynthesis and the MHC class I cell surface expression in HeLa cells. *Plos One*, 9-12, e95977.

CESTARI, I. & STUART, K. 2018. Transcriptional regulation of telomeric expression sites and antigenic variation in trypanosomes. *Current Opinion in Microbiology Genomics*, 19(2), 119-132.

CHAPLIN, D. 2010. Overview of the immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125, S3-S23.

SCHULZ, D., MUGNIER, M., PAULSEN, E., HEE-SOOK, K., CHUN-WA, C., TOUGH, D., RIOJA, I., PRINJHA, R., PAPAVALIOU, N. & DEBLER, E. 2015. Bromodomain proteins contribute to maintenance of bloodstream form stage. *PLoS One*, 8-13(12), e1002316.

DAVIES, G. & HAGEN, O. 1997. Systemic inflammatory response syndrome. *British Journal of Surgery*, 84, 920-935.

DE MUYLDER, G., DAULOUEDE, S., LECORDIER, L., UZUREAU, P., MORIAS, Y., VAN DEN ABEELE, J., CALJON, G., HERIN, M., HOLZMULLER,

P., SEMBALLA, S., COURTOIS, P., VANHAMME, L., STIJLEMANS, B., DE BAETSELIER, P., BARRETT, M. P., BARLOW, J. L., MCKENZIE, A. N. J., BARRON, L., WYNN, T. A., BESCHIN, A., VINCENDEAU, P. & PAYS, E. 2013. A *Trypanosoma brucei* kinesin heavy chain promotes parasite growth by triggering host arginase activity. *Plos Pathogens*, 9-14.

DENZER, K., VAN EIJK, M., KLEIJMEER, M., JAKOBSON, E., DE GROOT, C. & GEUZE, H. 2000. Follicular dendritic cells carry MHC class II-expressing microvesicles at their surface. *Journal of Immunology*, 165, 1259–1265.

DROR, J., LASENBY, R. & POSPELOV, M. 2017. New constraints on light vectors coupled to anomalous currents. *Physical Review Letters*, 119(14):141803.

DUSZENKO, M., GINGER, M., BRENNAND, A., GUALDRÓN-LÓPEZ, M., COLOMBO, M., COOMBS, G., COPPENS, I., SINGHAM, B., LANGSLEY, G., DE CASTRO, S., MENNA-BARRETO, R., MOTTRAM, J., NAVARRO, M., RIGDEN, D., ROMANO, P., STOKA, V., TURK, B. & MICHELS, P. 2011. Autophagy in protists. *Autophagy*, 7(2):127-58.

ECKLE, G., TURNER, J., ROSSJOHN, J. & MCCLUSKEY, J. 2013. Predisposed alpha beta T cell antigen receptor recognition of MHC and MHC-I like molecules? *Current Opinion in Immunology*, 25, 653-659.

EDGAR, J. 2016. Q&A: What are exosomes, exactly? *BMC Biology*, 14:46.

ELIAZ, D., KANNAN, S., SHAKED, H., ARVATZ, G., TKACZ, D., BINDER, L., BEN-ASHER, H., OKALANG, U., CHIKNE, V., COHEN-CHALAMISH, S. & SHULAMIT M.. 2017. Exosome secretion affects social motility in *Trypanosoma brucei*. *PLoS Pathogens*, 13(3), e1006245.

ENANGA, B., BURCHMORE, S., STEWART, L. & BARRETT, P. 2002. Sleeping sickness and the brain. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59, 845- 858.

ESCOLA, J., KLEIJMEER, M., STOORVOGEL, W., GRIFFITH, J., YOSHIE, O. & GEUZE, H. 1998. Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 20121–20127.

FARGEAS, C., WU, Y., NAKAJIMA, T., COX, D., NUTMAN, T. & DELESPESE, G. 1992. Differential effect of transforming growth factor-beta on the synthesis of Th1 - and Th2-Lymphokines by human T lymphocytes. *European Journal of Immunology*, 22, 2173-2176.

FAROOQI, A., DESAI, N., QURESHI, Z., LIBRELOTTO, D., GASPARRI, M., BISHAYEE, A., NABAVI, M., CURTI, V. & DAGLIA, M. 2018. Exosome biogenesis, bioactivities and functions as new delivery systems of natural compounds. *Biotechnology Advances*, 36(1), 328-334.

FENN, K. & MATTHEWS, R. 2007. The cell biology of *Trypanosoma brucei* differentiation. Identity in the African Trypanosome. *Current Opinion in Microbiology*, 10(6), 539–546.

GEIGER, A., BOSSARD, G., SERENO, D., PISSARRA, J., LEMESRE, J. L., VINCENDEAU, P. & HOLZMULLER, P. 2016. Escaping deleterious immune response in their hosts: lessons from Trypanosomatids. *Frontiers in Immunology*, 7-21.

GEIGER, A., HIRTZ, C., BECUE, T., BELLARD, E., CENTENO, D., GARGANI, D., ROSSIGNOL, M., CUNY, G. & PELTIER JB. 2010. Exocytosis and protein secretion in *Trypanosoma*. *BMC Microbiology*, 10:20.

GHOSH, J., BOSE, M., ROY, S. & BHATTACHARYYA, N. 2013. *Leishmania donovani* targets Dicer1 to downregulate miR-122, lower serum cholesterol, and facilitate murine liver infection. *Cell Host Microbe Journal*, 13(3), 277–288.

GIORDANI, F., MORRISON, L. J., ROWAN, T. G., DE KONING, H. P. & BARRETT, M. P. 2016. The animal trypanosomiasis and their chemotherapy: a review. *Parasitology*, 143, 1862-1889.

GIORDANI, F., MORRISON, L., ROWAN, T., KONING, H., & BARRETT, M. 2016. The animal trypanosomiasis and their chemotherapy: a review. *Parasitology*, 143(14), 1862-1889.

GNIPOVÁ, A., ŠUBRTOVÁ, K., PANICUCCI, B., HORVÁTH, A., LUKEŠ, J. & ZÍKOVÁ, A. 2015. The ADP/ATP carrier and its relationship to oxidative phosphorylation in ancestral protist *Trypanosoma brucei*. *Eukaryot Cell*, 14(3), 297-310.

GOBERT, A. P., DAULOUEDE, S., LEPOIVRE, M., BOUCHER, J. L., BOUTEILLE, B., BUGUET, A., CESPUGLIO, R., VEYRET, B. & VINCENDEAU, P. 2000. L-arginine availability modulates local nitric oxide production and parasite killing in experimental trypanosomiasis. *Infection and Immunity*, 68, 4653-4657.

HARDING, C., HEUSER, J. & STAHL, P. 1984. Endocytosis and intracellular processing of transferrin and colloidal gold-transferrin in rat reticulocytes: Demonstration of a pathway for receptor shedding. *European Journal of Cell Biology*, 35, 256–263.

HARRIS, H., MANSFIELD, M. & PAULNOCK, M. 2007. CpG oligodeoxynucleotide treatment enhances innate resistance and acquired immunity to African trypanosomes. *Infection Immunology*, 75(5), 2366-23673

HARTY, T., TVINNEREIM, R. & WHITE, W. 2000. CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annual Review of Immunology*, 18, 275- 308.

HEIJNEN, H., SCHIEL, A., FIJNHEER, R. GEUZE, H. & SIXMA, J. 1999. Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood*, 94, 3791–3799.

HORN, D. 2014. Antigenic variation in African trypanosomes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 195, 123-129.

ILEMOBADE, A. 2009. Tsetse and trypanosomosis in Africa: the challenges, the opportunities. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 76(1):35–40.

- IMHOF, S., KNUSEL, S., GUNASEKERA, K., VU, XL. & RODITI, I. 2014. Social motility of African trypanosomes is a property of a distinct life-cycle stage that occurs early in tsetse fly transmission. *PLoS Pathogens*, 10(10), e1004493
- JAMONNEAU, V., ILBOUDO, H., KABORE, J., KABA, D., KOFFI, M., SOLANO, P., GARCIA, A., COURTIN, D., LAVEISSIERE, C., LINGUE, K. BUSCHER, P. & BUCHETON, B. 2012. Untreated human infections by *Trypanosoma brucei gambiense* are not 100% fatal. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 6 (6), e1691
- JAMONNEAU, V., RAVEL, S., GARCIA, A., KOFFI, M., TRUC, P., LAVEISSIERE, C., HERDER, S., GREBAUT, P., CUNY, G. & SOLANO, P. 2004. Characterization of *Trypanosoma brucei* s.l. infecting asymptomatic sleeping sickness patients in Cote d'Ivoire: a new genetic group? *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 98, 329-337.
- JOINER, A. 1988. Complement evasion by bacteria and parasites. *Annual Review of Microbiology*, 42, 201-230.
- KEATING, J., YUKICH, O., SUTHERLAND, S., WOODS, G. & TEDIOSI, F. 2015. Human African trypanosomiasis prevention, treatment and control costs: A systematic review. *Acta Tropica*, 150, 4-13.
- KENNEDY, E. 2013. Clinical features, diagnosis, and treatment of human African trypanosomiasis (sleeping sickness). *Lancet Neurology*, 12, 186-194.
- KURIAKOSE, M., SINGH, R. & UZONNA, J. E. 2016. Host intracellular signaling events and pro-inflammatory cytokine production in African Trypanosomiasis. *Frontiers in Immunology*, 7, 181.
- LIU, G., SUN, L., WU, H., ZHANG, S., HUAN, X., XU, J., ZHANG, Q., ZHOU, H. & SHI, Q. 2015. Distinct contributions of CD4 (+) and CD8 (+) T cells to pathogenesis of *Trypanosoma brucei* infection in the context of gamma interferon and interleukin-10. *Infection and Immunity*, 83, 2785-2795.
- LOTT, K., ZHU, L., FISK, C., TOMASELLO, L. & READ, K. 2014. Functional interplay between protein arginine methyltransferases in *Trypanosoma brucei*. *Microbiology Open*, 3, 595-609.
- LUCKHEERAM, R. V., ZHOU, R., VERMA, D. & XIA, B. 2012. CD4 (+) T cells: Differentiation and functions. *Clinical & Developmental Immunology*, 12: 925135.
- LUNDKVIST, B., KRISTENSSON, K. & BENTIVOGLIO, M. 2004. Why trypanosomes cause sleeping sickness. *Physiology*, 19, 198-206.
- MAGEZ, S., STIJLEMANS, B., BARAL, T. & DE BAETSELIER, P. 2002. VSG-GPI anchors of African trypanosomes: their role in macrophage activation and induction of infection-associated immunopathology. *Microbes and Infection*, 4, 999-1006.
- MALVY, D. & CHAPPUIS, F. 2011. Sleeping sickness. *Clinical Microbiology and Infection*, 17, 986-995.
- MANTILLA, B., MARCHESE, L., CASAS-SÁNCHEZ, A., DYER, N., EJEH, N., BIRAN, M., BRINGAUD, F., LEHANE, M., SERRANO, A. & SILBER, A. 2017.

Proline metabolism is essential for *Trypanosoma brucei brucei* survival in the tsetse vector. *PLoS Pathogenes*, 23, 13(1), e1006158.

MATTHEWS, K. R. 2005. The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei*. *Journal of Cell Science*, 118, 283-290.

MOGENSEN, H. 2009. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clinical Microbiology Reviews*, 22, 240.

NAMANGALA, B. 2011. How the African trypanosomes evade host immune killing. *Parasite Immunology*, 33, 430-437.

NAMANGALA, B. 2012. Contribution of innate immune responses towards resistance to African Trypanosome infections. *Scandinavian Journal of Immunology*, 75, 5-15.

NAMANGALA, B., BRYN, L., MAGEZ, S., DE BAETSELIER, P. & BESCHIN, A. 2000. *Trypanosoma brucei brucei* infection impairs MHC class II antigen presentation capacity of macrophages. *Parasite Immunology*, 22, 361-370.

NORIS, M. & REMUZZI, G. 2013. Overview of complement activation and regulation. *Seminars in Nephrology*, 33, 479-492.

OBERHOLZER, M., LOPEZ, A., MCLELLAND, T. & HILL, L. 2010. Social motility in african trypanosomes. *PLoS Pathogenes*, 6(1), e1000739

PAULNOCK, M. & COLLIER, P. 2001. Analysis of macrophage activation in African trypanosomiasis. *Journal of Leukocyte Biology*, 69, 685-690.

PAULNOCK, M., FREEMAN, E. & MANSFIELD, M. 2010. Modulation of innate immunity by African Trypanosomes. *Parasitology*, 137, 2051-2063.

PONTE-SUCRE, A. 2016. An overview of *Trypanosoma brucei* infections: An intense host-parasite interaction. *Frontiers in Microbiology*, 7, 12.

RAJENDRAN, M., DANE, E., CONLEY, J. & TANTAMA, M.. 2007. Imaging adenosine triphosphate (ATP). *Biological Bulletin*, 231(1), 73-84.

RAPOSO, G., NIJMAN, W., STOORVOGEL, W., LEIJENDEKKER, R., HARDING, V., MELIEF, J. & GEUZE, J. 1996. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *Journal Experimental Medecine*, 183, 1161-1172.

REINITZ, M. & MANSFIELD, M. 1998. Independent regulation of B cell responses to surface and subsurface epitopes of African trypanosome variable surface glycoproteins. *Jornal of Immunology* 15; 141(2):620-626.

REIS, H., SCHWEBS, M., DIETZ, S., JANZEN, J. & BUTTER, F. 2018. TelAP1 links telomere complexes with developmental expression site silencing in African trypanosomes. *Nucleic Acids Reserch.*, 10, 1093.

ROCHE, A. & FURUTA, K. 2015. The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Nature Reviews Immunology*, 15, 203-216.

ROCK, L., REITS, E. & NEEFJES, J. 2016. Present yourself by MHC class I and MHC class II molecules. *Trends in Immunology*, 37, 724-737.

SALMON, D., VANWALLEGHEM, G., MORIAS, Y., DENOEUDE, J., KRUMBHOLZ, C., LHOMME, F., BACHMAIER, S., KADOR, M., GOSSMANN, J., DIAS, F. B. S., DE MUYLDER, G., UZUREAU, P., MAGEZ, S., MOSER, M., DE BAETSELIER, P., VAN DEN ABEELE, J., BESCHIN, A., BOSHART, M. & PAYS, E. 2012. Adenylate cyclases of *Trypanosoma brucei* inhibit the innate immune response of the host. *Science*, 337, 463-466.

SCHOREY, S., CHENG, Y., SINGH, P. & SMITH, L. 2015. Exosomes and other extracellular vesicles in host-pathogen interactions. *EMBO Reports*, 16(1), 24-43.

SCHROEDER, W. & CAVACINI, L. 2010. Structure and function of immunoglobulins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125, 41-52.

STERNBERG, M. 2004. Human African trypanosomiasis: clinical presentation and immune response. *Parasite Immunology*, 26, 469-476.

STEVERDING, D. 2008. The history of African trypanosomiasis. *Parasites & Vectors*, 1, 8.

STIJEMANS, B., GUILLIAMS, M., RAES, G., BESCHIN, A., MAGEZ, S. & DE BAETSELIER, P. 2007. African trypanosomiasis: From immune escape and in immunopathology to immune intervention. *Veterinary Parasitology*, 148, 3-13.

STOORVOGEL, W., STROUS, J., GEUZE, J., OORSCHOT, V. & SCHWARTZ, L. 1991. Late endosomes derive from early endosomes by maturation. *Cell*, 65, 417-427.

STOORVOGEL, W., KLEIJMEER, M., GEUZE, H. & RAPOSO, G. 2002. The biogenesis and functions of exosomes. *Traffic*, 3(5), 321-330.

SZEMPRUCH, J., SYKES, S., KIEFT, R., DENNISON, L., BECKER, A. & GARTRELL, A. 2016. Extracellular vesicles from *Trypanosoma brucei* mediate virulence factor transfer and cause host anemia. *Cell*, 164(1-2), 246-257.

TANOWITZ, B., SCHERER, E., MOTA, M. & FIGUEIREDO, M. 2017. Adipose tissue: A safe haven for parasites? *Trends in Parasitology*, 33(4), 276-284.

THAKUR, K., ZHANG, H., BECKER, A., MATEI, I., HUANG, Y., COSTA-SILVA, B., ZHENG, Y., HOSHINO, A., BRAZIER, H., XIANG, J., WILLIAMS, C., RODRIGUEZ-BARRUECO, R., SILVA, M., ZHANG, W., HEARN, S., ELEMENTO, O., PAKNEJAD, N., MANOVA-TODOROVA, K., WELTE, K., BROMBERG, J., PEINADO, H. & LYDEN, D. 2014. Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. *Cell Research*, 24(6), 766-769.

THE'RY, C., BOUSSAC, M., VERON, P., RICCIARDI-CASTAGNOLI, P., RAPOSO, G. & AMIGORENA, S. 2001. Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: A secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *Journal of Immunology*, 166, 7309-7318.

THE'RY, C., REGNAULT, A., GARIN, J., WOLFERS, J., ZITVOGEL, L., RICCIARDI-CASTAGNOLI, P., RAPOSO, G. & AMIGORENA, S. 1999. Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73. *Journal Cell Biology*, 147, 599-610.

THEODOS, M. & MANSFIELD, M. 1990. Regulation of B cell responses to the variant surface glycoprotein molecule in trypanosomiasis. II. Down-regulation of idiotype expression is associated with the appearance of lymphocytes expressing antiidiotypic receptors. *Immunology*, 144(10), 4022-4029.

TONG, Q., CHEN, R., KONG, Q., GOOSSENS, J., RADWANSKA, M., LOU, D., DING, J., ZHENG, B., FU, Y., WANG, T., STEFAN, M. & LU, S. 2018. DNA detection of *Trypanosoma evansi*: Diagnostic validity of a new assay based on loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Veterinary Parasitology*, 250, 1-6.

TORR, J. & VALE, A. Know your foe: lessons from the analysis of tsetse fly behavior. 2015. *Trends in Parasitology*, 31 (3), 95-99.

TRINDADE, S., RIJO-FERREIRA, F., CARVALHO, T., PINTO-NEVES, D., GUEGAN, F., ARESTA-BRANCO, F., BENTO, F., YOUNG, A., PINTO, A., VAN DEN ABEELE, J., RIBEIRO, M., DIAS, S., SMITH, K., FIGUEIREDO, M., TRINDADE, S., RIJO-FERREIRA, F., CARVALHO, T., PINTO-NEVES, D., GUEGAN, F., ARESTA-BRANCO, F., BENTO, F., YOUNG, A., PINTO, A., VAN DEN ABEELE, J., RIBEIRO, M., DIAS, S., SMITH, K. & FIGUEIREDO, M. 2016. *Trypanosoma brucei* parasites occupy and functionally adapt to the adipose tissue in mice. *Cell Host & Microbe*, 19(6), 837-848.

VICKERMAN, K., TETLEY, L., HENDRY, K. & TURNER, C. 1988. Biology of African trypanosomes in the tsetse fly. Biology of the cell / under the auspices of the european cell biology organization. *Biology of Cell*, 64(2), 109-119.

VINCENDEAU, P. & BOUTEILLE, B. 2006. Immunology and immunopathology of African trypanosomiasis. *Anais Da Academia Brasileira De Ciencias*, 78, 645- 665.

VISHAL, C., EMMANOUILIDIS, L, DAWIDOWSKI, M, SCHLIEBS, W., SATTLER, M., POPOWICZ, G. & ERDMANN, R. 2017. Inhibitors of glycosomal protein import provide new leads against trypanosomiasis. *Microbiology Cell*, 4(7), 223–229.

VONCKEN, F., GAO, F., WADFORTH, C., HARLEY, M. & COLASANTE, C.. 2013. The phosphoarginine energy-buffering system of *Trypanosoma brucei* involves multiple arginine kinase isoforms with different subcellular locations. *PLoS One*, 8(6), e65908.

YADAV, U. & KHAN M. 2018. Targeting the GPI biosynthetic pathway. *Pathogens and Global Health*, 27, 1-8.

ZHOU, R., CHEN, K., ZHANG, J., XIAO, B., HUANG, Z., JU, C., SUN J., ZHANG, F., LV, X. & HUANG, G. 2018. The decade of exosomal long RNA species: an emerging cancer antagonist. *Molecular Cancer*, 17 (1), 75.

ZITVOGEL, L., REGNAULT, A., LOZIER, A., WOLFERS, J., FLAMENT, C., TENZA, D., RICCI-ARDI-CASTAGNOLI, P., RAPOSO, G. & AMIGORENA, S. 1998. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nature Medecine*, 4, 594.